

**Die Auswirkungen pathogener Mutationen im Lamin A/C-Gen und  
siRNA-Untersuchungen in humanen Kulturzellen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

vorgelegt von

Kim Rita Bechert

aus Bochum

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland  
2. Referentin: Prof. Dr. Brigitte Jockusch  
eingereicht am: 11.12.2003  
mündliche Prüfung am: 02.03.2004

### **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

#### **Publikationen**

Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T., Weber, K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. J. Cell Sci. 114: 4557-4565 (2002).

Bechert, K., Lagos-Quintana, M., Harborth, J., Weber, K., Osborn, M. Effects of expressing lamin A mutant proteins causing Emery-Dreifuss muscular dystrophy and familial partial lipodystrophy in HeLa cells. Exp. Cell Res 286: 75-86 (2003).

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Der Zellkern und die Lamine	1
1.2 Die Funktion der Lamine	5
1.3 Laminopathien	6
1.4 Zielsetzung und thematische Einordnung der Arbeit	9
<b>2 Material und Methoden</b>	12
2.1 Material	12
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	12
2.1.2 Medium-Komponenten	12
2.1.3 Enzyme	12
2.1.4 Gebrauchswaren	12
2.1.5 Synthetische Oligonukleotide	13
2.1.6 Vektoren und Bakterienstämme	13
2.1.7 Humane Zellen	14
2.1.8 Antikörper	14
2.1.9 Puffersysteme und Standardlösungen	16
2.1.10 Bakterienmedien und Kulturplatten	17
2.1.11 Längenstandards	18
2.1.12 Sonstige Materialien	18
2.2 Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1 DNA-Techniken	18
2.2.1.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von DNA-Lösungen	18
2.2.1.2 Präzipitation von DNA	19
2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese von DNA	19
2.2.1.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	19
2.2.1.5 Präparation von Plasmiden	20
2.2.1.6 Restriktionsverdau	20
2.2.1.7 Ligationsreaktionen	20
2.2.1.8 Dephosphorylierung von DNA	21
2.2.1.9 Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA	21
2.2.1.10 Polymerasekettenreaktion	22
2.2.1.11 <i>In vitro</i> -Mutagenese durch PCR	26
2.2.1.12 Sequenzanalysen	26
2.2.1.13 Herstellung von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen	26
2.2.2 RNA-Techniken	27
2.2.2.1 Arbeiten mit siRNAs	27
2.2.2.1.1 Erstellung von siRNAs	27
2.2.2.1.2 Verwendete siRNAs	27



2.2.2.1.3	Hybridisierung der RNA-Einzelstränge	28
2.2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen	28
2.3	Proteinchemische Methoden	28
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	28
2.3.2	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung R250	30
2.3.3	Protein-Transfer auf Nitrozellulose (Western-Blotting)	31
2.3.4	Expression von rekombinanten Proteinen	32
2.3.5	Präparation eines Lysates aus <i>E.coli</i>	32
2.3.6	Reinigung von nativem GST-Fusionsprotein	33
2.3.7	Dialyse	34
2.3.8	Ionenaustausch-Chromatographie	34
2.3.9	Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen	35
2.3.10	Massenspektroskopie	35
2.3.11	Aminosäure-Sequenzanalyse	35
2.3.12	Rotationsbedampfung	35
2.4	Zellbiologische Methoden	36
2.4.1	HeLa-Zellkultur	36
2.4.2	Ernte von HeLa-Zellen	36
2.4.3	Zytoskelettpräparation aus HeLa-Zellen	36
2.4.4	Transfektion von HeLa-Zellen	37
2.4.5	“TUNEL”-Test	38
2.4.6	Hitzeschock	39
2.4.7	Überprüfung der Teilungsfähigkeit und Morphologie transfizierter Zellen <i>in vivo</i>	39
2.4.8	Proteinvorbereitung für die Elektrophorese	40
2.5	Immunologische Methoden	40
2.5.1	Immunfluoreszenzmikroskopie	40
2.5.2	Detektion von Proteinen durch Antikörper (Immunoblot)	42
2.6	Liste der verwendeten Primer	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	44
3.1	Die globulären Lamin-Schwanz-Domänen	44
3.1.1	Humanes Lamin A/C	44
3.1.2	Lamin aus <i>Caenorhabditis elegans</i>	49
3.2	Mutationen in LMNA und deren Auswirkungen auf HeLa-Zellen	55
3.2.1	Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) und Partielle Familiäre Lipodystrophie, Dunnigan-Typ (FPLD) – Die Mutationen G465D, R482L, R527P in LMNA	55
3.2.1.1	Erstellung des Lamin A-Wildtyp-Konstruktes	56
3.2.1.2	Einführung der Mutationen G465D, R482L und R527P in das Lamin A Wildtyp-Konstrukt	58

3.2.1.3	Arbeiten mit den Lamin A-Wildtyp- und Mutanten-Konstrukten	59
3.2.1.4	Auszählung des Phänotyp 1	61
3.2.1.5	Sind Aggregat tragende Zellen apoptotisch?	64
3.2.1.6	Genauere Untersuchung der Flag-Lamin A-Aggregate	65
3.2.1.7	Ausmaß der Überexpression von Flag-Lamin A in HeLa-Zellen	69
3.2.1.8	Überprüfung der Teilungsfähigkeit von Zellen mit Aggregaten	71
3.2.1.9	Wie reagieren Flag-Lamin A-Aggregate tragende Zellen auf Stress?	72
3.2.1.10	Doppelfärbungen – Auswirkungen der Delokalisation von Flag-Lamin A auf andere Lamine und Lamina assoziierte Proteine	73
3.2.1.11	Expression der Lamin A-Schwanz-Domäne in HeLa-Zellen	76
3.2.2	Das Hutchinson-Gilford-Progeria-Syndrom – Die Mutation G608G (GGC→GGT) in LMNA	77
3.2.2.1	Konstrukt-Erstellung für die Untersuchung der HGPS-Mutation	77
3.2.2.2	Auswirkung der HGPS-Mutation auf HeLa-Zellen	80
3.3	<i>Silencing</i> von LMNA und STA (Emerin)	82
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	85
4.1	Die Strukturaufklärung der globulären Lamin-Schwanz-Domänen	85
4.2	Aggregat-Bildung als Mutanten spezifischer Effekt und als Auswirkung der Überexpression	85
4.3	Zusammenhang zwischen Phänotypen und Krankheiten	88
4.4	Einfluss der Aggregat-Bildung auf andere Lamine und Lamina assoziierte Proteine	88
4.5	Einfluss der Mutationen auf Teilungsfähigkeit und Kernstabilität	90
4.6	Laminopathie-Modelle	91
4.7	Positionen der Aminosäuren G465, R482 und R527 in der Lamin A-Ig-Domäne	93
4.8	Gründe für die fehlgeschlagene Rekrutierung der globulären Lamin A-Schwanzdomäne ins Kerninnere	93
4.9	Die Progeria-Mutation	94
4.10	Funktionelle Analyse der Lamine durch RNA-Interferenz	94
4.11	Ausblick	95
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	97
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	100

## Abkürzungen

Abs.	Absolut
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C-	carboxy-
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds-DNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
mA	Milliamper
mRNA	Boten-RNA
N-	amino-
NLS	Kernlokalisierungssignal
NPC	Kernporenkomplex
OD	optische Dichte

PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfu	Plaque bildende Einheit
pH	pH-Wert (Konzentration der Wasserstoffionen in einer Flüssigkeit)
pI	isoelektrischer Punkt
PP	Polypropylen
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
XGal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Zellkern und die Lamine

In der eukaryontischen Zelle trennt die Kernhülle die DNA vom Zytoplasma ab. Die Kernhülle besteht aus einer inneren und einer äußeren Kernmembran, die durch einen perinucleären Raum getrennt sind. Kernporen (NPCs = *nuclear pore complexes*) durchspannen diesen Raum und perforieren die Kernhülle, wodurch ein Austausch zwischen Zyto- und Karyoplasma gewährleistet ist. Die äußere Kernmembran geht in die Membran des endoplasmatischen Reticulums über. Beide Membranen haben Ribosomen gebunden und sind in ihrer Zusammensetzung ähnlich. Die innere Kernmembran ist frei von Ribosomen und mit integralen Membranproteinen versehen, die Bindungsstellen für Heterochromatin und die Lamina liefern. Die Lamina liegt im Kerninnern unmittelbar der inneren Kernmembran an. In der *Xenopus*-Oocyte ist sie ein zweidimensionales Gitter ineinander verschlungener Filamente (AEBI et al. 1986). Für *Drosophila*-Larven und menschliche HeLa-Zellen ist sie als dreidimensionales fibrilläres Netzwerk, das größere freie Bereiche ausweist, beschrieben worden (PADDY et al. 1990). Die Lamina setzt sich aus den Laminen zusammen, die der Superfamilie der Intermediärfilamente (IF) zugehörig sind und innerhalb dieser Familie die Klasse V bilden. Die Klassen I-IV der IF-Proteine sind im Gegensatz zu den kernständigen Laminen zytoplasmatisch.

Charakteristisch für die IF-Proteine ist eine dreiteilige Domänenorganisation bestehend aus einem zentralen, stabförmigen Abschnitt ("rod"), der N-terminal von einer Kopf- und C-terminal von einer Schwanzdomäne flankiert wird (GEISLER und WEBER 1982). Die Rod-Domäne besteht aus vier  $\alpha$ -helikalen Abschnitten (1a, 1b, 2a und 2b), die durch kurze *Linker*-Sequenzen verbunden sind (Lamine: MCKEON et al. 1986, FISHER et al. 1986). Mit Hilfe der  $\alpha$ -Helices können sich zwei Monomere umeinander wickeln und einen stabilen *Coiled-coiled*-Dimer bilden. Zwei Dimere formen wiederum einen Tetramer, der mit einem weiteren Tetramer durch Kopf/Schwanz-Anordnung ein Protofilament darstellt. Die Protofilamente bilden durch laterale Assoziation dicke fibrilläre Strukturen (STUURMAN et al. 1998). Die Lamine unterscheiden sich von den zytoplasmatischen Intermediärfilamenten der Vertebraten und niederen Chordaten in einigen Punkten (Figure 1): In *Coil 1B* der Lamine befinden sich 42 zusätzliche Aminosäuren (MCKEON et al. 1986, FISHER et al. 1986). Die Kopf-Domäne der Lamine ist deutlich

kürzer. In der globulären Schwanz-Domäne ist ein hoch konservierter Abschnitt von etwa 105 Aminosäuren (RIEMER et al. 2000) vorhanden. Es existiert ein Kernlokalisationsignal (NLS = *nuclear localisation signal*), und am C-terminalen Ende der meisten Lamine befindet sich eine CaaX-Box, die posttranslational modifiziert wird. Einem Cystein (C) folgen zwei aliphatische Aminosäuren (a) und ein carboxyterminaler Rest X. Das Cystein der CaaX-Box wird farnesyliert, der -aaX-Rest proteolytisch entfernt und die neue Carboxylgruppe methyliert. Das dabei entstehende hydrophobe Ende scheint für die Direktion (neben dem NLS) und Verankerung der Lamine zur beziehungsweise in die Kernmembran verantwortlich zu sein (KROHNE et al. 1989, KITTEN und NIGG 1991, VORBURGER et al. 1989). Die Struktur der globulären Lamin A-Schwanzdomäne ist inzwischen aufgeklärt und als Ig-Domäne beschrieben worden (DHE-PAGANON et al. 2002, KRIMM et al. 2002).

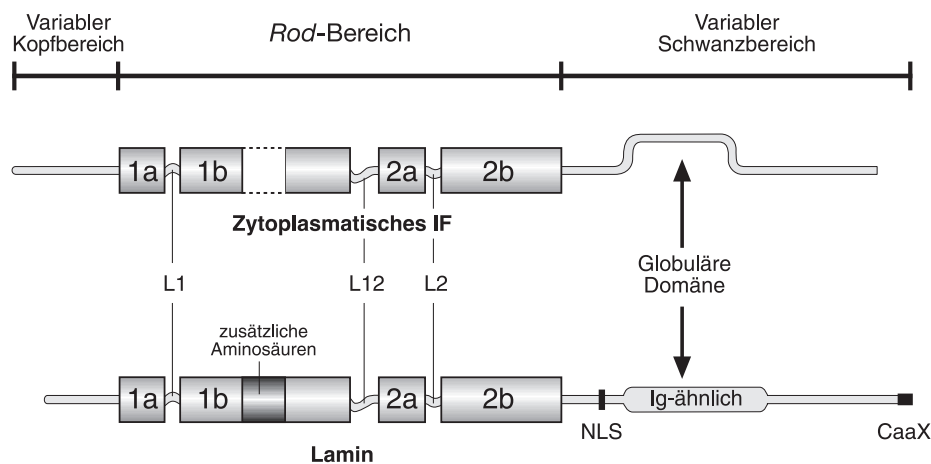


Figure 1: Schematische Darstellung eines zytoplasmatischen Intermediärfilamentproteins und eines kernständigen Lamins. Sowohl den zytoplasmatischen Intermediärfilamenten als auch den kernständigen Laminen ist eine dreiteilige Domänenorganisation mit zentralem Rod-, einem Kopf- und einem Schwanzbereich gemein. Der Rod-Bereich besteht aus vier  $\alpha$ -helikalen Coiled-coil-Segmenten (1a, 1b, 2a, 2b), die durch flexible nicht helikale Linker-Regionen (L1, L12 und L2) miteinander verbunden sind. Der Kopf- und der Schwanzbereich sind in ihrer Länge zwischen den einzelnen Intermediärfilament-Proteinen variabel. Die Schwanzdomäne der Lamine beinhaltet einen globulären Bereich, dessen Struktur für Lamin A/C als Ig-Domäne erkannt ist. Die Hauptunterschiede zwischen den zytoplasmatischen IFs der Vertebraten und niederen Chordaten und den Laminen sind: kurze Lamin-Kopfdomäne, 42 zusätzliche Aminosäuren in Coil 1b bei Laminen, Kernlokalisationssequenz (NLS) der Lamine und CaaX-Box der Lamine.

Während der Zellteilung wird die Kernhülle im Zuge der offenen Mitose aufgelöst und in jeder Tochterzelle neugebildet. Dieser Prozess geht mit Zerfall und Aufbau der Lamina einher. Die Lamin-Polymere de- und polymerisieren nach Phosphorylierung beziehungsweise Dephosphorylierung von konservierten Serin-Resten in der Nähe der *Rod*-Domäne (DESSEV et al. 1991, PETER et al. 1990). Mutationen in diesen Resten inhibieren die Lamin-Depolymerisierung und induzieren einen Arrest des Zellzyklus (HEALD UND MCKEON et al. 1990).

In Säugetieren besteht die Klasse V der Intermediärfilament-Familie, die Lamine, aus drei Genen, die für sieben Lamin-Proteine kodieren (Figur 2). Sie werden in zwei Gruppen eingeteilt, die A-Typ- und die B-Typ-Lamine. Ein wesentlicher Unterschied der beiden Gruppen ist, dass die B-Typ-Lamine während der Mitose bedingten Auflösung der Lamina membrangebunden bleiben. Die A-Typ-Lamine sind während der Mitose gelöst (GERACE UND BLOBEL 1980). Wenigstens eines der B-Typ-Lamine wird während der Embryogenese in allen Geweben konstitutiv exprimiert, wohingegen die A-Typ Lamine erst später in der Entwicklung in ausdifferenzierten Geweben exprimiert werden (RÖBER et al. 1989). Es gibt vier A-Typ-Lamine: Lamin A, C, AΔ10 und C2, die durch alternatives Spleißen des Gens LMNA entstehen. Lamin A und C sind bis auf eine Lamin A-spezifische 90 Aminosäuren lange und eine Lamin C-spezifische sechs Aminosäuren lange Region am jeweiligen C-terminalen Ende identisch. Lamin C und C2 fehlt die CaaX-Box, die bei den übrigen Laminen isoprenyliert wird (siehe oben). Lamin A wird nach der Isoprenylierung weiter prozessiert, indem durch proteolytische Spaltung die letzten 18 Aminosäuren entfernt werden (WEBER et al. 1989). Die Variante Lamin AΔ10 hat eine 30 Aminosäuren Deletion im Lamin A-spezifischen Teil, die dem Exon 10 entspricht. Es wird in normalen und in Tumorzellen gefunden (MACHIELS et al. 1996). Lamin C2 wird in männlichen Keimzellen exprimiert (FURUKAWA et al. 1994). Bei dieser Variante ist die Aminosäuresequenz, die Exon 1 entspricht, verkürzt. Hier werden sechs Aminosäuren (GNAEGR) kodiert, die C2-spezifisch sind. Sie treten an die Stelle der 85 N-terminalen Aminosäuren von Lamin C. Die B-Typ-Lamine werden durch zwei Gene vertreten, LMNB1 und LMNB2. Für LMNB1 ist ein Produkt, Lamin B1, bekannt. Für LMNB2 wurden zwei Gen-Produkte, Lamin B2 und B3, gefunden. Lamin B3 wird nicht wie B1 und B2 konstitutiv exprimiert, sondern erscheint analog zu Lamin C2 nur in

männlichen Keimzellen (FURUKAWA und HOTTA et al. 1993). In Lamin B3 sind die 208 N-terminalen Aminosäuren des Lamin B2 durch 85 Aminosäuren ersetzt worden.

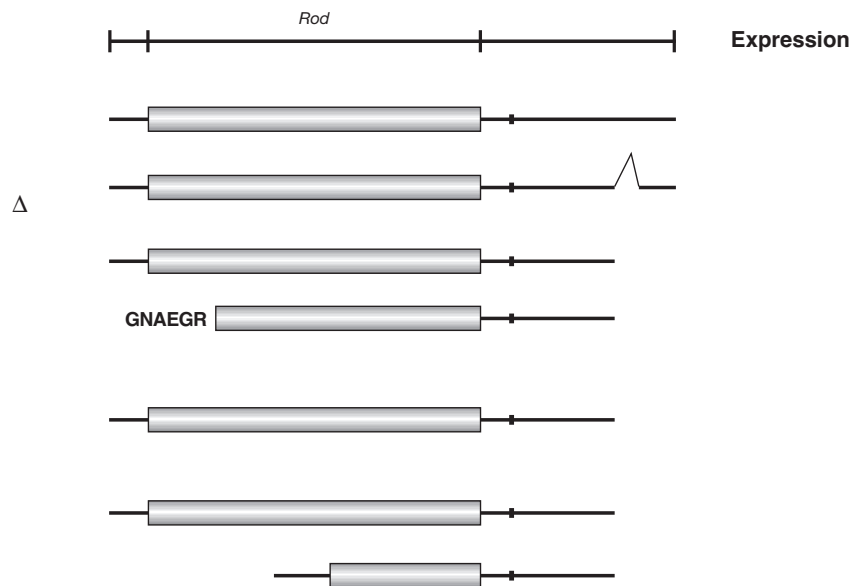


Figure 2: Schematische Darstellung der A- und B-Typ-Lamine der Säugetiere. Zu den A-Typ-Laminen gehören Lamin A, Lamin  $\Delta 10$ , Lamin C und Lamin C2, die alle Produkte des Gens LMNA sind. Zu den B-Typ-Laminen gehören Lamin B1, B2 und B3. Lamin B1 auf der einen und Lamin B2 und B3 auf der anderen Seite sind jeweils Produkte der Gene LMNB1 beziehungsweise LMNB2. Die A-Typ-Lamine werden erst später in der Entwicklung in ausdifferenzierten Zellen exprimiert, wohingegen Lamin B1 und B2 konstitutiv exprimiert werden. Lamin C2 und B3 werden spermatocyten-spezifisch exprimiert. Die Rod-Domäne ist als schwarzes Rechteck hervorgehoben. NLS (*nuclear localisation signal*) = Kernlokalisierungssignal, CaaX = CaaX-Box

Der Invertebrat *Caenorhabditis elegans* besitzt nur ein Lamin-Gen (LMN-1), welches für ein B-Typ-Lamin, genannt *Ce-Lamin*, kodiert (LIU et al. 2000). Dieses Lamin hat eine Deletion von 14 Aminosäuren in *Coil 2b* und eine kürzere Schwanzdomäne als die A-Typ-Lamine der Säugetiere. *Drosophila melanogaster* hat zwei Lamine, ein B-Typ-Lamin genannt Lamin Dm0 und ein A-Typ-ähnliches Lamin genannt Lamin C (BOSSIE und SANDERS 1993, GRUENBAUM et al. 1988). In den Genomen von Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* und Reis) und Hefen (*Saccharomyces cerevisiae* und *pombe*) konnten keine Lamine nachgewiesen werden. Im Krallenfrosch *Xenopus laevis* gibt es wenigstens fünf Lamine: B1, B2, Lamin L III, Lamin A und IV. Lamin IV ist Spermatocyten spezifisch.



In *Xenopus*-Oozyten werden nur die Lamine L III (auch B3 genannt), B2 und B1 exprimiert, wobei die beiden letzteren nur in sehr geringen Mengen vorkommen und Lamin L III der Hauptbestandteil der Oozyten-Lamina ist. Lamin L III wird von einem eigenen Gen kodiert und hat insofern eine Sonderstellung, als es weder den A-Typ noch den B-Typ-Laminen eindeutig zugeordnet werden kann (HOFEMEISTER et al. 2002).

## 1.2 Die Funktion der Lamine

Die Lamine beziehungsweise die Lamina vermitteln dem Kern Stabilität und Form. So zeigten beispielsweise Zellkerne aus *Caenorhabditis elegans* eine veränderte Morphologie, nachdem die Expression seines einzigen Lamins (*Ce*-Lamin) durch RNA-Interferenz (RNAi) inhibiert worden war. Darüber hinaus zeigten diese Zellkerne eine geringere Resistenz gegenüber Deformationen als die Zellkerne des Wildtyps (LIU et al. 2000). In *C. elegans* ist *Ce*-Lamin schon für die embryonale Entwicklung essentiell. Die Eliminierung von *Ce*-Lamin in *C. elegans* führte im Embryo spätestens nach der Bildung von einigen hundert Zellen zum Arrest (LIU et al. 2000).

Die Lamine spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Organisation der Kernhülle. Sie sind wichtig für eine korrekte Positionierung und Verknüpfung angrenzender NPCs (LENZ-BÖHM et al. 1997, LIU et al. 2000, SMYTHE et al. 2000, PANTE et al. 1994) und für die Rekrutierung und Verankerung integraler und peripherer Membranproteine wie beispielsweise Emerin, LBR (*lamin-B-receptor*) und der meisten der LAP-Isoformen (*lamina-associated-polypeptides*) (FOISNER und GERACE et al. 1993, WORMAN et al. 1988). Zwei der LAP-Isoformen besitzen im Gegensatz zu den übrigen keine Membran-Bindungsdomäne. Eines von ihnen, LAP2 $\alpha$ , bindet an Lamin A (DECHAT et al. 2000). Emerin bindet ebenfalls an Lamin A (CLEMENTS et al. 2000) und ist in seiner Lokalisation von dessen Existenz abhängig. In LMNA - (-/-) - Zellen von LMNA-Null-Mäusen ist ein großer Teil des Emerins im Zytoplasma wieder zu finden (SULLIVAN et al. 1999).

Ebenso scheinen die Lamine bei ihrem Einbau in die Lamina voneinander abhängig zu sein. So verbleibt in Zellkulturzellen Lamin A im Nukleoplasma bis sich die B-Typ-Lamin-Filamente in der Telophase zusammenfügen (MOIR et al. 2000). In Lamin A-freien Tumor-Zelllinien lokalisiert Lamin C im Nukleoplasma oder dem Nukleolus und

wird nach Transfektion der Zellen mit GFP-Lamin A zusammen mit diesem in die Lamina inkorporiert (VAUGHAN et al. 2001).

Die Rolle der Lamine bei der Regulation der Transkription manifestiert sich durch die Tatsache, dass sie zum einen eine Chromatin-Bindungsdomäne besitzen (GLASS et al. 1993), und zum anderen, dass gerade Heterochromatin lokal eng mit der Lamina assoziiert ist (BELMONT et al. 1993, BOYLE et al. 2001). Darüber hinaus kolokalisieren beziehungsweise interagieren Lamine mit einer Reihe von spezifischen Transkriptionsfaktoren. Zu diesen gehören unter anderen Oct-1, ein Kollagenase-Repressor (IMAI et al. 1997), pRB (Retinoblastomprotein), das für den Eintritt in die S-Phase benötigt wird (MANCINI et al. 1994), und SREBP1 (*sterol response element binding protein 1*), welches in die Regulation der Cholesterol-Biosynthese und in die Adipogenese involviert ist (LLOYD et al. 2002).

Lamine haben ebenfalls eine Funktion bei der DNA-Replikation, da eine Immunodepletion von B-Typ-Laminen in *Xenopus*-Ei-Extrakten die Ausbildung von kleinen Zellkernen zur Folge hat, die keine DNA-Replikation initiieren können. Durch Zugabe von aufgereinigtem Lamin B zu den Extrakten vergrößern sich die Kerne, und DNA-Replikation kann wieder initiiert werden (MEIER et al. 1991, GOLDBERG et al. 1995). Zusätzlich ist zu beobachten, dass ein Teil des Lamina-ständigen Lamin B1 in der S-Phase von der Kernhülle zu Zentren der DNA-Replikation umverteilt wird (MOIR et al. 1994).

Weiterhin haben die Lamine eine Bedeutung bei der RNA-Transkription, da in Zellen von *Xenopus*-Embryonen eine Zerstörung der Lamina durch eine dominant-negative Lamin-Mutante die Aktivität der RNA-Polymerase II inhibiert (SPANN et al. 2002).

### 1.3 Laminopathien

1999 wurde erstmals durch BONNE et al. darüber berichtet, dass Mutationen des Lamin A/C-Gens (LMNA) eine Erbkrankheit verursachen. Die betroffenen Patienten zeigten den Phänotyp für die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD), die erstmals 1966 beschrieben wurde (EMERY UND DREIFUSS 1966). Bis 1999 wurde diese Krankheit nur mit Mutationen im STA-Gen in Verbindung gebracht und X-gebunden vererbt (X-EDMD). STA kodiert für das integrale Kernmembranprotein Emerin.

Mittlerweile sind über 70 verschiedene Mutationen im Lamin A/C-Gen beschrieben worden, die an teilweise überlappenden Aminosäurepositionen zu 8 beziehungsweise 9 verschiedenen Krankheiten führen. Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie wird in Zusammenhang mit LMNA meistens autosomal dominant (AD-EDMD) aber auch rezessiv vererbt (AR-EDMD). Die meisten der Mutationen in LMNA betreffen die autosomal dominante Form der EDMD. Weitere den Muskeldystrophien zugehörige Krankheiten sind: Dilatative Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörungen Typ 1A (*Dilated Cardiomyopathie* = DCM1A) und die Gliedergürtel-Muskeldystrophie vom Typ 1B (*LGMD1B, limb girdle muscular dystrophy 1B*). Einen -im zweiten Fall teilweise- lipodystrophischen Phänotyp zeigen die Partielle Familiäre Lipodystrophie, Dunnigan-Typ (FPLD = *Dunnigan-type familial partial lipodystrophy*), und die Mandibuloakrale Dysplasie (MAD). Außerdem wurden Mutationen in LMNA bei der Neuropathie Charcot-Marie-Tooth'sche Erkrankung vom Typ 2B1 (CMT2B1) und die zwei Formen der Progerie, Hutchison-Gilford-Syndrom (Progeria infantum) und Werner-Syndrom (Progeria adultorum), gefunden. Es sind einige Mutationen beschrieben worden, die einen sehr komplexen Phänotypen aufweisen, der als Multisystemdystrophie-Syndrom bezeichnet wird. Die Gesamtheit dieser Krankheiten zuzüglich der X-EDMD und der das Lamin-B-Rezeptor-Gen betreffenden Pelger-Huet-Anomalie wird unter dem Begriff Laminopathien zusammengefasst. Diese Krankheiten sind mit ihren Phänotypen und wichtigsten Referenzen in Tabelle 1 aufgelistet. Die entsprechenden Aminosäurepositionen in Lamin A sind in Figur 3 graphisch dargestellt.

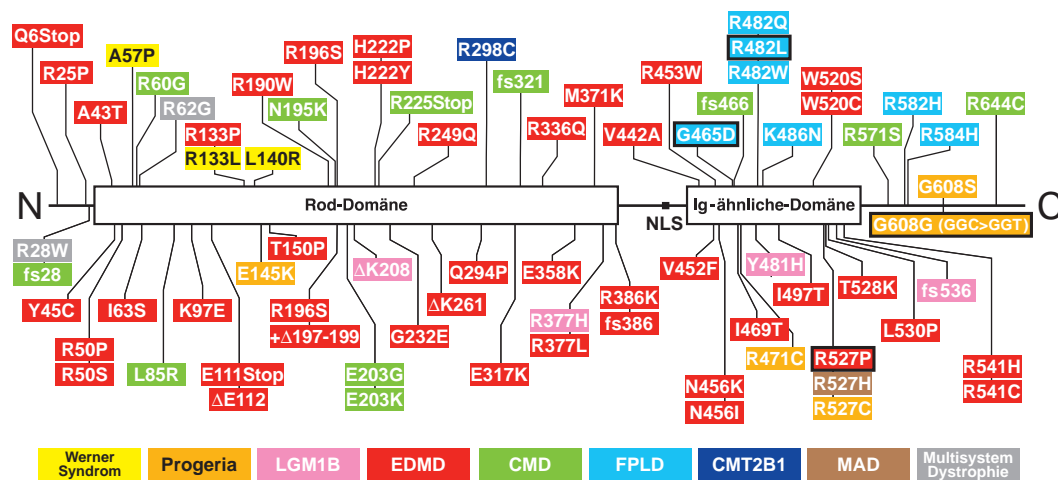
Tabelle 1: LMNA-Laminopathien

Krankheit mit Erbgang	Klinischer Phänotyp	Wichtige Referenzen
Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD) Autosomal dominanter und rezessiver Erbgang	<ul style="list-style-type: none"> <li>· frühzeitige Kontrakturen der Knöchel-, Ellenbogen- und Achillessehne und der post-zervikalen Muskeln</li> <li>· progrediente humeroperoneale Muskelschwäche</li> <li>· kardiale Leitungsstörungen "Conduction block"</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Emery und Dreifuss 1966</li> <li>· Emery 1989</li> <li>· Bonne et al. 1999</li> <li>· Di Barletta et al. 2000</li> </ul>
Partielle Familiäre Lipodystrophie, Dunnigan-Typ (FPLD), Autosomal dominanter Erbgang	<ul style="list-style-type: none"> <li>· mit Einsetzen der Pubertät: Schwund von subkutanem Fettgewebe der oberen und unteren Extremitäten der Glutealregion und des Rumpfes mit progressiver Fettzell Degeneration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Shackelton et al. 2000</li> <li>· Cao und Hegele 2000</li> <li>· Köbberling und .</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Gleichzeitige Akkumulation von Fettgewebe im Gesicht- und Nackenbereich und der Leistengegend (Folgen: Doppelkinn und <i>buffalo hump</i>)</li> <li>· insulinresistenter Diabetes mellitus</li> <li>· Hypertriglyzeridämien</li> </ul>	Dunnigan 1986
Giedergürtel-Muskeldystrophie, Typ 1B (LGM1B), Autosomal dominanter Erbgang	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Muskeldystrophien mit proximaler Muskelschwäche, vermehrt in den Beinen, weniger in den Armen</li> </ul>	· Muchir et al. 2000
Dilatative Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörungen, Autosomal dominanter Erbgang	<ul style="list-style-type: none"> <li>· dilatierende Kardiomyopathien</li> <li>· eingeschränkte Funktion des linken oder beider Ventrikel</li> <li>· Reizleitungsanomalien</li> <li>· “conduction pump failure”</li> </ul>	· Fatkin et al. 1999
Mandibuloakrale Dysplasie (MAD), Autosomal rezessiver Erbgang	<ul style="list-style-type: none"> <li>· mandibulare und clavikulare Dysplasien</li> <li>· Akroosteolyse</li> <li>· verspäteter Verschluss der Cranial-Naht</li> <li>· Gelenk-Kontrakturen</li> <li>· Lipodystrophie Muster A und B</li> </ul>	· Novelli et al. 2002
Charcot-Marie-Tooth'sche, Erkrankung Typ 2B1 (CMT2B1), Autosomal rezessiver Erbgang	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Reduktion der Axondichte</li> <li>· Demyelinierung der Axone</li> <li>· Verfall von peripheren Muskeln</li> </ul>	· De Sandre-Giovannoli et al. 2002
Progeria infantum (Hutchinson-Gilford-Syndrom), Autosomal rezessiver Erbgang	<ul style="list-style-type: none"> <li>· runzelige pergamentartige Haut</li> <li>· ergrauendes Kopfhaar mit Glatzenbildung</li> <li>· Nageldystrophien</li> <li>· proportionierter Zwergwuchs (Wachstumsstillstand) mit Akromikrie</li> <li>· Permanenz des Milchgebisses</li> <li>· Muskel- und Genitalhypoplasie</li> <li>· Osteoporose</li> <li>· Arthrose</li> <li>· Kontrakturen</li> <li>· verstärkte Kopfvenenzeichnung</li> <li>· durchschnittl. Lebenserwartung: 13 Jahre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· DeBusk 1972</li> <li>· Eriksson et al. 2003</li> </ul>
Progeria adultorum (Werner-Syndrom), Autosomal rezessiver Erbgang	<ul style="list-style-type: none"> <li>· sklerodermieartige Hautveränderungen mit Verkalkungen</li> <li>· mageres Greisengesicht</li> <li>· allgemeine Gefäßsklerose</li> <li>· Katarakt</li> <li>· Diabetes mellitus</li> <li>· vorzeitige Impotenz</li> <li>· Tod häufig im 5. Lebensjahrzehnt</li> </ul>	· Chen et al. 2003
Multisystemdystropie-Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Veränderungen im Fettgewebe</li> <li>· Veränderungen der Herz- und Skelettmuskulatur</li> </ul>	· Garg et al. 2002

*Missense*-Mutationen stellen die häufigste Form der Mutationen in LMNA dar. *Non-sense*- und *Frameshift*-Mutationen und Deletionen sind ebenfalls vorhanden, kommen aber seltener vor. Die stille Mutation der Progeria infantum (G608G) bildet eine Aus-

nahme. Hier wird durch das mutations-bedingte Entstehen einer zusätzlichen Spleißstelle das Lamin A-Protein an seinem C-Terminus um 50 Aminosäuren verkürzt.



Figur 3: Mutationen in Lamin A, die Krankheiten im Menschen verursachen. N-terminus (N) und C-terminus (C) sind angegeben. Die Rod- und Ig-ähnliche Domäne sind in Form von Rechtecken hervorgehoben. Die farbliche Unterlegung der Mutationen an den jeweiligen Aminosäurepositionen ist in der Legende den Krankheiten zugeordnet worden. LGM1B = Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 1B, EDMD = Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, DCM1A = Dilatative Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörungen Typ 1A, FPLD = Partielle Familiäre Lipodystrophie, Dunnigan-Typ, CMTB1 = Charcot-Marie-Tooth'sche Erkrankung Typ 2B1, MAD = Mandibuloakrale Dysplasie. Da Lamin A und C bis zur Aminosäure 566 identisch sind, betreffen Mutationen, die in der Sequenz vor diesem Rest liegen, beide Spleißformen. R571S ist Lamin C spezifisch. Für CMT2B und MAD wurden bisher jeweils nur Mutationen an einer Aminosäureposition gefunden (R298C, R527H). Die schwarz gerahmten Mutationen kennzeichnen die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen. NLS = Kernlokalisationssignal, fs = frameshift-Mutation, Δ = Deletionen

## 1.4 Zielsetzung und thematische Einordnung dieser Arbeit

1. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den globulären Teil der Schwanzdomäne von humanem Lamin A und *Caenorhabditis elegans*-Lamin aufzureinigen und zu kristallisieren. Gerade dieser Bereich ist im Menschen für die Bindung der integralen und peripheren Membranproteine Emerin und LAP2α wichtig. Er entspricht in etwa der durch RIEMER et al. beschriebenen "105-Box", einem hochkonservierten Sequenzbereich innerhalb der Gruppe der Lamine.

2. Zu Beginn der Arbeit war der Zusammenhang zwischen LMNA und vier der Laminopathien (EDMD, FPLD, DCM und LGMD1B) und weniger als 30 Mutationen bekannt. Ausser den klinischen Phänotypen waren keine weiteren Auswirkungen auf molekularer Ebene bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Mutationen G465D (FPLD), R482L (FPLD) und R527P (EDMD) auf molekularer Ebene zu analysieren. Dazu wurden die Mutationen in Plasmid ständiges LMNA eingeführt und Wildtyp und mutierte Varianten in HeLa-Zellen exprimiert und verglichen. Dabei wurden unter Berücksichtigung der Überexpression der Konstrukte die Auswirkung auf bekannte Bindungs- und Assoziationspartner von Lamin A/C wie Lamin B1 und B2, Emerin, LAP2 und das Kernporenprotein Nup153, sowie der Einfluss der Mutationen auf Stabilität und Teilungsfähigkeit der Zellen untersucht.

Gegen Ende der Arbeit veröffentlichten ERIKSSON et al. 2003, dass Progeria-Patienten eine stille Mutation (G608G) in ihrem Lamin A/C-Gen tragen. Auch diese Mutation wurde in die Arbeit mit einbezogen, indem mit Hilfe der PCR (*Polymerase chain reaction*) die verkürzte Lamin A-cDNA erzeugt wurde. Das resultierende Konstrukt wurde in HeLa-Zellen exprimiert und mit dem Wildtyp-Lamin A-Kulturen verglichen.

3. In Zellkultur-Zellen kann mit Hilfe von siRNA-Duplices (*small interfering RNAs*) die Expression eines spezifischen Gens post-transkriptionell herunterreguliert werden (ELBASHIR et al. 2001). ELBASHIR und Kollegen setzten diese Methode zum ersten Mal in menschlichen Zellkultur-Zellen erfolgreich ein. Sie transfizierten HeLa-Zellen mit siRNAs, die gegen LMNA-Transkripte gerichtet waren, und zeigten, dass die Expression von Lamin A/C durch die verwendeten siRNAs reduziert worden war. Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die Reduktion eines nicht essentiellen Proteins, wie Lamin A/C, in Kulturzellen weitere Konsequenzen beispielsweise auf seine Bindungspartner hat und die Methode der RNA-Interferenz mittels siRNAs für die funktionelle Genanalyse eingesetzt werden kann. Die Bindung von Lamin A an das Transmembranprotein Emerin ist bekannt (DECHAT et al. 2000). Außerdem fanden SULLIVAN und Mitarbeiter in LMNA-Null-Mäusen eine Delokalisation von Emerin ins Zytoplasma (SULLIVAN et al. 1999). Folglich wurden in dieser Arbeit HeLa-Zellen mit Lamin A/C-siRNA-Duplices transfiziert, um die Lokalisation von Emerin in diesen Zellen durch Immunfluoreszenz - Mikroskopie zu ermitteln. Das gleiche wurde umgekehrt für die

Lamin A/C-Lokalisation in HeLa-Zellen durchgeführt, in denen Emerin mit entsprechenden Duplices reduziert worden war.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, in “per analysis”- Qualität von den Firmen Baker (Deventer, NL), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen.

#### 2.1.2 Medium-Komponenten

Bactoagar, Trypton und Hefeextrakt stammten von Difco (Kansas City, USA). Glukose wurde von der Firma Sigma verwendet.

#### 2.1.3 Enzyme

DNA-amplifizierende und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Promega (Madison, USA) und Takara Bio Inc. (Shiga, Japan) bezogen.

Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Beverly, USA) verwendet.

Enzyme für spezielle Methoden werden unter den jeweiligen Versuchsdurchführungen benannt.

#### 2.1.4 Gebrauchswaren

Eppendorf, Hamburg	0,5; 1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen
Greiner, Frickenhausen	50 ml PP-Röhrchen
Becton Dickson Labware New Jersey, USA	<sup>a</sup> Falcon Plastikröhrchen in diversen Ausführungen
Nunc InterMed, Wiesbaden	Petrischalen
Sarstedt, Nürnberg	1,5 ml Reaktionsgefäße und 15 ml Plastikröhrchen
Eastman Kodak, USA	Biomax MR1-Röntgenfilme
Polaroid, GB	Polaplanfilme
Schleicher & Schüll, Dassel	Nitrozellulosemembran, Sterilfiltereinheiten



Biozym Diagnostik, Hameln      Agarose  
 Whatmann, Maidstone, GB      Filterpapier

### 2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische DNA-Oligonukleotide wurden von den Firmen IBA (Göttingen) in gebrauchsfertiger wässriger Lösung (0,1 nmol/μl) und von MWG-Biotech (Ebersberg) als Trockenpellet geliefert. Sie wurden üblicherweise, in “Molecular Biology Grade“-Qualität bezogen; und für Quantitative-PCR wurden durch HPLC aufgereinigte Oligonukleotide verwendet.

SiRNA-Einzel- und Doppelstränge lieferte Dharmacon (Lafayette, USA) in getrockneter Form, insoweit sie nicht von der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Tuschl (Abteilung für Zelluläre Biochemie, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) hergestellt wurden. Dehydrierte Oligonukleotide wurden in einem definierten Volumen RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Konzentration wurde auf 20 μM eingestellt.

### 2.1.6 Vektoren und Bakterienstämme

#### Vektoren

pCR 2.1-TOPO	TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, NL
pCR-Blunt II-TOPO	Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen
pFLAG-CMV-5a	Sigma
pGEX-4T-1	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
pCS <sup>2+</sup> (Flag)	siehe unten

Der pCS<sup>2+</sup>-Vektor (RUPP et al. 1994) ermöglicht eine Expression in prokaryontischen und eukaryontischen Systemen. Der hier verwendete pCS<sup>2+</sup>(Flag)-Vektor besitzt im Polylinker I ein zwischen die *Bam*HI und *Eco*RI-Schnittstellen eingesetztes Flag-Antikörperepitop (Sequenz: Asp\_Tyr\_Lys\_Asp\_Asp\_Asp\_Asp\_Lys). Die *Bam*HI-Schnittstelle wurde dabei zerstört (KÖBERNICK, 2000). Zur Selektion transformierter Bakterien diente das Ampicillinresistenz-Gen (*amp*).

Das Plasmid, welches die LMN-1-cDNA (*C.elegans*-Lamin) enthielt, wurde von Dr. A. Karabinos (diese Abteilung) zur Verfügung gestellt.

### Bakterienstämme

Es wurden verschiedene Genotypen des *Escherichia coli* Stammes K12 für die vorliegende Arbeit verwendet. Die Klonierungen wurden hauptsächlich mit dem „Zero Blunt TOPO PCR System“ und mit dem „TOPO-TA-Cloning System“ durchgeführt. Die zugehörigen Bakterienstämme waren:

**TOP 10:** F' *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\Phi80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74recA1$  *deoR* *araD139*  $\Delta(ara-leu)7697$  *galU galK rpsL* (*Str<sup>R</sup>*) *endA1 nupG*

**TOP10F':** F' (*lacI<sup>q</sup>* Tn10(*Tet<sup>r</sup>*) *crA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\Phi80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74recA1$  *araD139*  $\Delta(ara-leu)7697$  *galU galK rpsL* (*Str<sup>r</sup>*) *endA1 nupG*).

Für Proteinexpressionen wurde folgender Bakterienstamm verwendet:

**BL-21** (DE3)pLys (Stratagene): B F' *dmc ompT hsdS*(*r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>*) *galI* (DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]

### **2.1.7 Humane Zellen**

HeLa SS6-Zellen

### **2.1.8 Antikörper**

Primäre Antikörper:

1. Anti-Lamin A, JOL4, monoklonaler Antikörper aus Maus (Abcam, Cambridge, UK)
2. Anti-Lamin B1, monoklonaler Antikörper aus Maus (Zymed Inc., San Francisco, CA)
3. Anti-Lamin B2, Klon LN43.2, monoklonaler Antikörper aus Maus (Novocastra, Newcastle, UK)
4. Anti-Lamin C, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (C. Hutchison, University of Durham, UK)
5. Anti-Lamin A/C, Klon 636, monoklonaler Antikörper aus Maus (von M. Osborn, diese Abteilung)
6. Anti-Emerin, Klon 4G5, monoklonaler Antikörper aus Maus (Novocastra)
7. Anti-LAP2, Klon 27, monoklonaler Antikörper (Transduktion Laboratories, Lexington, USA)
8. M2 anti-FLAG, monoklonaler Antikörper aus Maus (Sigma-Aldrich)

9. Anti-FLAG, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen
10. Anti-Nup 153, monoklonaler Antikörper aus Maus (von B. Burke, University of Calgary, Canada)
11. V9 Anti-Vimentin, monoklonaler Antikörper aus Maus (von M. Osborn, diese Abteilung)

Eingesetzte Antikörpervedünnungen für Immunfluoreszenzen und Western Blots:

	Antikörper	Eingesetzte Verdünnungen		
		Einzelfärbung	Doppelfärbung	Western Blot
1	Anti-Lamin A	unverdünnt	unverdünnt	-
2	Anti-Lamin B1	1:10	unverdünnt	-
3	Anti-Lamin B2	1:100	1:25	-
4	Anti-Lamin C	1:50	1:25	-
5	Anti-Lamin A/C	1:200	-	1:50
6	Anti-Emerin	1:100	1:50	-
7	Anti-LAP2	1:500	1:250	-
8	M2 anti-FLAG	1:500	1:250	-
9	Anti-FLAG (polyklonal)	1:500	1:150, mit B1 und B2 1:250	-
10	Anti-Nup153	unverdünnt	unverdünnt	-
11	Anti-Vimentin V9	-	-	1:10 000

Sekundäre Antikörper:

1. FITC-gekoppelter Ziege anti-Maus Immunglobulin-Antikörper (Dianova, Hamburg)
2. Rhodamin-gekoppelter Ziege anti-Maus Immunglobulin-Antikörper (Dianova)
3. Rhodamin-gekoppelter Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin-Antikörper (Dianova)
4. Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Schaf anti-Maus Immunglobulin Antikörper, Bestandteil des "ECL western blotting analysis system" (Amersham Biosciences)

## Eingesetzte Verdünnungen:

	Antikörper	Eingesetzte Verdünnungen	
		Einzelfärbung	Doppelfärbung
1	FITC-gekoppelter Ziege anti-Maus	1:40	1:20
2	Rhodamin-gekoppelter Ziege anti-Maus	1:80	1:40
3	Rhodamin-gek. Ziege anti-Kaninchen	1:40	1:20, Lamin A u. B2 Doppelfärbungen 1:10
4	Peroxidase-gek. Schaf anti-Maus	Nur Western Blot: 1:20 000	

**2.1.9 Puffersysteme und Standardlösungen**

PBS, pH 7,8	137 mM	NaCl
	7 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,7 mM	KCl
10 x TBE, pH 8,3	215,63 g	Tris-Base
	119,80 g	Borsäure
	14,80 g	EDTA
	ad 2000 ml	H <sub>2</sub> O
TBS	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
1 x TC (10/1)	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	CDTA, pH 8,0
1 x TE (10/1)	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0
1 x SM	0,58 g	NaCl
	0,2 g	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O

	5 ml	1 M Tris-HCl, pH 7,5
	0,5 ml	2% (w/v) Gelatine
	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O
5 x Ladepuffer	3,03 g	Tris-Base
	0,87 g	CDTA
	1,25 g	2,5% (w/v) Sarcosyl Na-Salz
	25,00 ml	50,0% (v/v) Glycerin BRL
	0,005 g	10% (w/v) Bromphenolblau
	ad 50 ml	H <sub>2</sub> O
2 x SDS	10 g	SDS
	0,05 g	Bromphenolblau
	3,03 g	Tris-Base
	20 g	Glycerin
	ad 80 ml H <sub>2</sub> O, rühren und 20 Minuten im Wasserbad kochen.	
	Nach Abkühlen den pH auf 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen.	

### 2.1.10 Bakterienmedien und Kulturplatten

Alle Nährmedien wurden bei 120°C autoklaviert. Die Antibiotika wurden sterilfiltriert (0.2 µm) und aufgrund ihrer Hitzeinstabilität erst nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von 50°C den Medien zugesetzt.

LB-Medium:	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1000 ml
SOB-Medium:	20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,59 g NaCl, 0,19 g KCl ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O
SOC-Medium:	20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,59 g NaCl, 0,19 g KCl, 20 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glukose ad 1000ml H <sub>2</sub> O
2 x YT-Medium:	16 g Bacto-Trypton, 10 g Hefeextrakt, 10g NaCl ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
1M IPTG:	1,00 g IPTG in 4,19 ml H <sub>2</sub> O

2% (w/v) X-Gal: 1,00 g X-Gal in 50 ml DMF

Antibiotikazusätze: 50 µg/ml Ampicillin in H<sub>2</sub>O (USB-Amersham, Braunschweig)  
 10 µg/ml Kanamycin in H<sub>2</sub>O (Sigma)  
 34 µg/ml Chloramphenicol in Ethanol (Sigma)

#### Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Bactoagar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren, Abkühlen auf circa 50°C und Zugabe der Antibiotika konnten die Agarplatten unter der Heissluftglocke des Bunsenbrenners in Petrischalen (Ø 8,5 cm) gegossen werden. Um die Platten für eine Blau/Weiß-Selektion verwenden zu können, wurde vor dem Ausplattieren der Bakterien je 40 µl einer 0,1 M IPTG-Stammlösung und 40 µl einer 2% (w/v) X-Gal-Stammlösung auf der Agarplatte mit einem Trigalski-Spatel ausgestrichen.

#### **2.1.11 Längenstandards**

1. DNA-Standard: Kb DNA Ladder (Stratagene): in Basenpaaren: 12 000, 10 000, 9 000, 8 000, 7 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250
2. Protein-Standard: Sigmamarker, Low molecular weight range, in Kilodalton: 66, 45, 36, 29, 24, 20; 14,2; 6,5

#### **2.1.12 Sonstige Materialien**

cDNA-Banken: Humane Plazenta cDNA Bank (BD Biosciences clontech, Palo Alto, USA)

### **2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1 DNA-Techniken**

##### **2.2.1.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von DNA-Lösungen**

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Nach SAMBROCK et al. (1989) besteht bei Verwendung einer Küvette mit einer Schichtdicke von  $d = 1 \text{ cm}$  zwischen der gemessenen Dichte und der zu ermittelnden

Nukleinsäurekonzentration folgende Beziehung: 1 OD<sub>260</sub> entspricht 50 µg/ml ds-DNA. Das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> beträgt bei reiner DNA-Lösung etwa 1,8. Verunreinigungen durch Proteine senken diesen Wert. Der Quotient für die in der Arbeit verwendeten DNA lag stets zwischen 1,5 und 1,8.

#### **2.2.1.2 Präzipitation von DNA**

Zur Konzentrierung und Umpufferung der DNA wurde ethanolisch oder isopropanolisch gefällt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit Natriumacetat (pH 4,8, Endkonzentration = 0,3 M) oder Natriumchlorid (Endkonzentration = 0,25 M) angesalzen, gemischt und dann entweder mit zwei Volumina Ethanol oder 0,7 Volumina Isopropanol versetzt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 20 Minuten bis zu 36 Stunden bei -20°C wurden die Proben dann bei 14 000 rpm eine Stunde lang bei 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde im Anschluß mit 75%igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen im Speedvac oder auf einem 37°C Heizblock in sterilem Wasser aufgenommen.

#### **2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese von DNA**

Im Zuge der Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch Verwendung eines Standards konnten Größen- und ungefähre Konzentrationsbestimmungen der DNA in der Lösung gemacht werden. Es wurden 1-0,5%ige (w/v) Agarosegele mit 0,5x TBE als Gel- und Elektrophoresepuffer und einer Ethidiumbromid-Endkonzentration von 0,75 µg/ml verwendet. Die Agarose wurde zusammen mit dem Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf circa 60°C mit Ethidiumbromid versetzt. Zum Beladen der Geltaschen wurden die Proben mit 5x Ladepuffer gemischt.

#### **2.2.1.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Zur Abtrennung der gewünschten DNA von DNA-Fragmenten unerwünschter Größe und anderen Komponenten wie beispielsweise Primern, Salzen und Enzymen wurde die DNA zunächst auf einem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA-Bande der gewünschten Größe mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und schließlich die DNA aus dem Gelstück eluiert. Dazu wurde der QIAEX Gel Extraktions Kit (Qiagen)

analog zum Herstellerprotokoll verwendet. Die DNA wurde in sterilem Wasser oder 10 mM Tris, pH 8,0 aufgenommen.

#### **2.2.1.5 Präparation von Plasmiden**

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mittels alkalischer Lysis aus 3 beziehungsweise 20 ml LB-ÜN-Kulturen gewonnen und mittels Anionenaustausch-Chromatographie über DNA-bindende Säulen gereinigt. Dazu wurden der Plasmid Mini Kit (Qiagen) und der Qiafilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Die DNA wurde in 20 bzw. 100 µl TE (10/1) aufgenommen und bei –20°C gelagert.

#### **2.2.1.6 Restriktionsverdau**

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an spezifischen Erkennungssequenzen, wobei, je nach Enzym, an der Schnittstelle glatte oder kohäsive Enden erzeugt werden. Restriktionsendonukleasen wurden benutzt, um Vektoren zu analytischen Zwecken zu verdauen oder um DNA für Ligationen vorzubereiten. Es wurden 0,5-3,0 µg Plasmid-DNA analog des Herstellerprotokolles verdaut. Die verdaute DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit QIAEX II Gel Extraktions Kit (Qiagen), wie unter 2.2.4 beschrieben, eluiert.

#### **2.2.1.7 Ligationsreaktionen**

Die T4-DNA-Ligase verknüpft DNA-Fragmente mit kohäsiven und glatten Enden. Die Ligationsreaktion wurde zur Umklonierung verschiedener DNA-Abschnitte in Expressionsvektoren eingesetzt. Dazu wurden 100 ng Vektor-DNA und Insert-DNA in molaren Verhältnissen von 1:1 bis 3:1 gemischt. Dann wurde in einem Endvolumen von 10 µl mit je 1,0 µl T4-Ligase-Puffer und T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, 400U/µl) ÜN bei 14°C inkubiert.

DNA-Fragmente wurden auch zu amplifikatorischen Zwecken in Vektoren eingesetzt. In diesem Fall stammen die Fragmente aus einer Polymerasekettenreaktion und waren durch die matrizenunabhängige, terminale Transferaseaktivität der *Taq*-Polymerase mit 3'-Desoxyadeninüberhängen versehen, die komplementär zu den 3'-Desoxythymidinüberhängen des Vektors pCR2.1-TOPO sind. Katalysierendes Enzym ist eine, an den



Vektor kovalent gebundene Topoisomerase I. Die Fragmente mit T/A-Überhängen wurden mit Hilfe des “TOPO-TA-Cloning Kits” mit dem Vektor verknüpft. Fragmente mit “glatten” Enden wurden mit Hilfe des “Zero-Blunt TOPO Cloning Kits” ebenfalls durch Topoisomerase I-Aktivität mit dem zugehörigen “blunt end”-Vektor verknüpft.

#### **2.2.1.8 Dephosphorylierung von DNA**

Um die unerwünschte Religation von Vektoren zu vermeiden, die nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten worden waren oder an ihren Termini “glatte Enden” (*blunt ends*) aufwiesen, wurde die DNA mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die alkalische Phosphatase spaltet hydrolytisch Phosphorylgruppen ab, ohne die innerhalb der DNA keine Zucker-Phosphodiester-Brücken gebildet werden können.

Es wurden 1 µg Vektor-DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 1 x Dephosphorylierungspuffer unter Zusatz von 1 µl (20 U/µl) alkalischer Phosphatase (New England Biolabs) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl einer 0,2 M EGTA-Lösung und einer Inkubation für 10 Minuten bei 65°C gestoppt. Der Ansatz wurde, wie unter 2.2.1.4 beschrieben, geleluert.

#### **2.2.1.9 Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA**

Zur Transformation von *E.coli*-Zellen wurden Vektoren in transformationsfähige, d.h. kompetente Bakterienzellen (TOP10 und Top 10 F<sup>+</sup>, Invitrogen) gebracht. Dazu wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 50-100 µg Plasmid-DNA versehen und 20-30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad mit anschließender 2-minütiger Inkubation auf Eis. Zur Erholung wurden die Zellen mit SOC-Medium gemischt und im Schüttelinkubator bei 225 upm für 45-60 Minuten inkubiert. Eine durch den aufgenommenen Vektor vermittelte Antibiotikum-Resistenz diente zur Selektion von Zellen, welche das entsprechende Plasmid aufgenommen hatten. Die Bakterien wurden dann auf Antibiotikum-haltigen Agar-Platten ausplattiert und für mindestens 16 Stunden inkubiert. Im Falle einer “Blau/Weiss-Selektion” wurden die Platten wie unter 2.1.10 beschrieben vor Ausstrich der Bakterien mit IPTG und X-Gal versehen. Mit Insert-tragenden Vektoren transformierte Zellen bilden weisse Kolonien, während religierte Vektoren (ohne Insert) blaue Kolonien

erzeugen. Einzelne weisse Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte abgenommen und dienten zum Animpfen einer Bakterienkultur oder zur Durchführung einer “Kolonie-PCR”.

### 2.2.1.10 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion, abgekürzt PCR (*polymerase chain reaction*), ist eine *in vitro*-Methode zur Amplifizierung von Nukleotidsequenzen (MULLIS und FALLONA 1987). Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig der Sequenz komplementärer DNA-Stränge entsprechen. Die PCR setzt sich in der Regel aus fünf temperaturgesteuerten Schritten zusammen. Die Matrix-DNA wird zunächst einmalig durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Die Schritte zwei bis vier werden nun in einer Abfolge von 20-40 Schritten wiederholt. Dabei wird die DNA aufgeschmolzen. Dann lagern sich im nächsten Schritt die Primer an die Matrix-DNA an (*annealing*). Im letzten Schritt eines Zyklus, der Elongation, verlängert eine temperaturbeständige DNA-Polymerase die Primer an ihren 3'-OH-Enden durch Anhängen von Nukleotiden. Diese zyklischen drei Schritte amplifizieren somit den gewünschten DNA-Abschnitt. Zum Abschluss einer PCR werden eventuell nicht vollständig synthetisierte DNA-Stränge an ihren 3'-Enden aufgefüllt. Ein typisches PCR-Protokoll sieht wie folgt aus:

Reaktionsansatz:	5,0 l	10x-PCR-Puffer
	4,0 µl	dNTP-Mischung (2,5 mM für jedes Nukleotid)
	0,5 µl	<i>sense</i> -Primer (50 pmol)
	0,5 µl	<i>antisense</i> -Primer (50 pmol)
	2,0 µl	DNA (10-100 ng)
	0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U)
	37,5 µl	H <sub>2</sub> O
	50,0 µl	gesamt

Temperaturprotokoll:	95°C	2.00 min.	1. einmaliges Aufschmelzen	
	95°C	0.30 min.	2. Aufschmelzen	
	60°C	0.30 min.	3. Primer-Anlagerung	x 35 Zyklen
	72°C	3.00 min.	4. Elongation	
	72°C	10.00 min.	5. Auffüllreaktion	
	4°C	∞	6. Aufbewahrung	

Die Länge der Elongationszeit wurde in Abhängigkeit von der Grösse des Insert bei Einsatz einer *Taq*-Polymerase auf 1 Minute/1000 zu synthetisierende Basenpaare und für eine *Pfu*-Polymerase auf 2 Minuten/1000 bp gewählt. Die Optimal-Temperatur für die Elongation liegt für die *Pfu*-Polymerase bei 70°C. Die Temperatur des Primer-Anlagerungs-Schrittes war von der Schmelztemperatur abhängig. Sie konnte empirisch nach folgender Formel berechnet werden:

$$T_{\text{schmelz}} = 69,3[^\circ\text{C}] + 0,41 \times G + C [\text{mol}\%] - 650/L$$

$$T_{\text{anneal}} = (T1 + T2[^\circ\text{C}]) / 2 - 3$$

wobei gilt:  $T_{\text{schmelz}}$  : theoretische Schmelztemperatur [ $^\circ\text{C}$ ]

$T_{\text{anneal}}$  : theoretische *Annealing*-Temperatur [ $^\circ\text{C}$ ]

T1 : theoretische Schmelztemperatur *sense*-Primer

T2 : theoretische Schmelztemperatur *antisense*-Primer

L : Primerlänge in Basenpaaren

### “Touch-down”-PCR

Bei einer “Touch-down”-PCR wird die “Annealing-Temperatur” in den ersten Zyklen um je einen Grad Celsius pro Zyklus gesenkt. Ein typisches Temperaturprogramm sah wie folgt aus:

Temperaturprotokoll:	95°C	2.00 min.	1. einmaliges Aufschmelzen	
	95°C	0.30 min.	2. Aufschmelzen	
	6°C	0.30 min.	3. Primeranlagerung	
	↓			x 9 Zyklen
	56°C	0.30 min.		
	72°C	3.00 min.	4. Elongation	
	95°C	0.30 min.	5. Aufschmelzen	
	55°C	0.30 min.	6. Primeranlagerung	x 25 Zyklen
	72°C	3.00 min.	7. Elongation	
	72°C	7.00 min.	8. Auffüllreaktion	
	4°C	∞	9. Aufbewahrung	

### Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient dazu transformierte Bakterienkolonien auf die Anwesenheit des Vektors und die Anwesenheit des Inserts im Vektor zu überprüfen. Dazu wurde eine einzelne Kolonie mit dem Zahnstocher direkt von der Agarplatte abgenommen und in 10 µl H<sub>2</sub>O suspendiert. 1 µl davon dienten als Template für die PCR. Der Rest wurde zum Animpfen einer 3-ml-Bakterienkultur verwendet.

Ansatz für 10 Reaktionen:	10,0 µl	10 x PCR-Puffer
	8,0 µl	dNTP-Mischung (2,5 mM für des NTP)
	0,5 µl	sense-Primer (50 pmole)
	0,5 µl	antisense-Primer (50 pmole)
	1,0 µl	Taq-Polymerase (3,5-5,0 U)
	70,0 µl	H <sub>2</sub> O
	90,0 µl	gesamt

PCR-Ansatz für eine Reaktion:	9,0 µl	Premix
	1,0 µl	Bakteriensuspension
	10,0 µl	gesamt

### Quantitative RT-PCR

Bei der Quantitativen oder “real-time” RT-PCR (RT=*reverse transcription*) wird die Amplifikation einer Nukleinsäure bei gleichzeitiger Quantifizierung der Produkte in einem Gerät durchgeführt. Aus der Menge des Endproduktes kann dann auf die Menge des Ausgangsmaterials geschlossen werden. Das Ausgangsmaterial ist bei der Quantitativen RT-PCR im Gegensatz zur Quantitativen PCR nicht DNA, sondern mRNA. Die mRNA wird vor dem ersten Schritt des PCR-Zyklus in cDNA umgeschrieben. Reverse Transkription und PCR finden somit in einem Reaktionsansatz (“one step”) statt. Die PCR erfolgt unter Anwesenheit der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, welcher doppelsträngige DNA-Moleküle bindet und dadurch ein fluoreszierendes Signal emittiert. Die Zunahme der Amplifikate kann so unmittelbar gemessen werden. Als Ausgangsmaterial wird mRNA eingesetzt, die vor dem ersten Schritt des PCR-Zyklus in cDNA umgeschrieben wird. Das heisst, Reverse Transkription und PCR finden in einem Reaktionsansatz (“one step”) statt. Jedem PCR-Zyklus schließt sich ein sogenannter “plate read” an, bei dem die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I und somit die Quantität der DNA gemessen wird. Um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wird nach dem Ablauf der PCR-Zyklen eine Schmelzkurve der/des Produkte/s erstellt.

Für diese PCR wurde der QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) eingesetzt. Ein Standardprotokoll sieht wie folgt aus:

Ansatz pro Reaktion:	12,50 µl	SYBR-RT-PCR-Mix	
	0,25 µl	RT-Mix	
	1,00 µl	<i>sense</i> und <i>antisense</i> Primer (25 µM)	
	x µl	H <sub>2</sub> O	
	x µl	mRNA, 50 ng	
<hr/>			
	25,00 µl	Gesamtvolumen	
<hr/>			
Temperaturprotokoll:	50°C	30:00 Minuten	1. Schritt: Reverse Transkription
	95°C	15:00 Minuten	2. Schritt: Inaktivierung der Rev. Transkriptase + Aktivierung der Taq-Polymerasen
	94°C	00:15 Minuten	3. Schritt: Denaturierung

58-64°C	00:25 Minuten	4. Schritt: Primeranlagerung
72°C	00:45 Minuten	5. Schritt: Elongation
Plate Read, dann zurück zu Schritt 3, x 39		

#### **2.2.1.11 *In vitro*-Mutagenese durch PCR**

Zur Insertion von Punktmutationen wurden das QuikChange site-directed mutagenesis kit (Qiagen) verwendet. Hierbei wird der die zu mutierende Sequenz enthaltende Vektor einer PCR unterzogen, deren Primer in ihrer Mitte die gewünschte Mutation beinhalteten. Die Primer sind komplementär zueinander und werden durch die *Pfu*-Polymerase verlängert. Das dadurch entstehende Plasmid trägt die inserierte Mutation. Im Anschluss an die PCR wird das Produkt mit *DpnI* behandelt. Die *DpnI* Endonuklease ist spezifisch für hemimethylierte und methylierte DNA (Zielsequenz: 5'G<sup>m6</sup>ATC-3'), wie sie dem aus *E.coli* stammenden parentalen Plasmid entspricht. Es wird durch den Verdau abgebaut. Die neusynthetisierte DNA, welche keine Methylierung aufweist, wird dabei nicht gespalten. Die Durchführung der Mutagenese sowie die Kreation der Primer und Transformation der produzierten Plasmide erfolgte nach Herstellerangaben.

#### **2.2.1.12 Sequenzanalysen**

Sequenzierungen wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurde durch Midi-Präparation gewonnen Plasmid-DNA in dehydrierter Form versendet. Pro Sequenzierung wurden 1-5 µg DNA benötigt.

#### **2.2.1.13 Herstellung von kompetenten *E.coli*-Zellen**

Nach HANAHAN, 1983

Zur Inokulation wurde eine Bakterienkolonie mit einem sterilem Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen und in 50 ml SOB-Medium bis zu einer OD<sub>260</sub> = 0,9 angezogen. Die Kultur wurde dann in 50 ml PP-Röhrchen überführt und für 30 Minuten auf Eis gehalten. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 2 500 upm (Variofuge F Heraeus, Hanau) geerntet und in 15 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten auf Eis und ein weiterer Zentrifugationsschritt, dem folgend das Pellet in 4 ml Transformationspuffer + 10% (v/v) Glycerin durch

Vortexen resuspendiert wurde. Zur Lagerung wurden Aliquots von 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

Transformationspuffer: 45 mM MnCl  
 10 mM CaCl<sub>2</sub>  
 10 mM MES-KOH  
 pH 6,3

## 2.2.2 RNA-Techniken

### 2.2.2.1 Arbeiten mit siRNAs

Die Transfektion von Zellkultur-Zellen mit siRNA (siRNA = small interfering RNAs), kann die Expression eines Zielgens durch RNA-Interferenz sequenz-spezifisch und post-transkriptionell herunterreguliert und somit der Effekt auf die Zelle untersucht werden (ELBASHIR et al. 2001).

#### 2.2.2.1.1 Erstellung von siRNAs

Design: Für die Erstellung von siRNA-Duplicates sollen möglichst Sequenzen vom Typ AA(N<sub>19</sub>)UU (N = beliebiges Nukleotid) aus dem Leserahmen des Zielgens ausgesucht werden (ELBASHIR et al. 2002). In den betreffenden Genen waren keine passenden Sequenzabschnitte aufzufinden. Die siRNAs wurden deshalb nach dem Schema AA(N<sub>21</sub>) erstellt. Es wurden GC-Gehalte von ungefähr 50-70% gewählt und der Bereich 50-100 Nukleotide abwärts vom Startcodon ausgeschlossen.

Synthese: Die eingesetzten 21-nt RNAs wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Tuschl, Abteilung Zelluläre Biochemie (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) hergestellt.

#### 2.2.2.1.2 Verwendete siRNAs

Zielgen	mRNA-Sequenz	Nukleotid-Position im Gen
LMNA	aacuggacuuccagaagaacauc	608-630
STA	aaccgugcuccuggggcuggggcu	628-650

### 2.2.2.1.3 Hybridisierung der RNA-Einzelstränge

Je 20 µM des *sense*- und *antisense*-Stranges wurden zunächst für 1 Minute bei 90°C und anschließend 1 Stunde bei 37°C in Hybridisierungs-Puffer inkubiert.

Hybridisierungs-Puffer: 100 mM Kaliumacetat  
 30 mM HEPES-KOH, pH 7,4  
 2 mM Magnesiumacetat  
 in RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O

### 2.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen

Für den Einsatz in der quantitativen PCR wurde Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen isoliert. Dazu wurde der RNeasy-Kit (Qiagen) verwendet. Von zwei konfluenten Schälchen einer 24-Loch-Platte von “*knock-down*”- und nicht transfizierten Zellen wurden das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit je 350 µl RLT-Puffer (+β-Mercaptoethanol), nachdem das Medium abgesaugt worden war, durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vom Untergrund gelöst und die Lysate vereint. Das Zelllysate wurde 5 Minuten aus dem Eppendorf-Schüttler kräftig geschüttelt. Im weiteren Verlauf wurde nach Herstellerangaben verfahren (Handbuch 06/2000, Seite 34f, Schritt 4). Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und auf Eis gehalten. Für den anschließenden DNase-Verdau wurden je 2,0 µg RNA mit je 2,0 µl RQ I RNase-freien DNase (Promega) und RQ I-Puffer in einem Volumen von 20,0 µl gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die anschließende Erhöhung der Temperatur 20 Minuten lang auf 64°C gestoppt. Die RNA wurde in 10-µl-Aliquots bei –20°C gelagert.

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese ist eine diskontinuierliche Elektrophorese. Die Gelmatrix besteht aus zwei Bereichen: einem weitporigen Sammelgel, pH 6,8, und einem engporigen Trenngel, pH 8,8. Die Probe läuft zunächst langsam durch das weitporige Sammelgel. Hier werden die Proteine in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten “gestapelt”. Es



erfolgt ein Vortrennung und eine Aufkonzentrierung. Im engporigen Trenngel löst sich der "Proteinstapel" auf, die Proteine werden neu arrangiert und nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt.

SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung von Proteinen effektiv überdeckt. Bei der Probenvorbereitung wurden die Proteine mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst. Schwefelbrücken wurden durch die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgespalten.

### Gelherstellung

Nach U. K. LAEMMLI 1970

Die Trenngellösung wurde zwischen zwei abgeschlossene Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation (2 h) wurde das Isopropanol dekantiert und mit H<sub>2</sub>O gespült. Dann wurde die Sammelgellösung darauf gegeben, in das die Kämme eingesetzt wurden.

Die Elektrophorese für ein Gel mit H = 10,2 cm, B = 8,2 cm und T = 0,5 mm erfolgte bei konstanter Stromstärke von 10-15 mA. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Brilliant-Blau R250 (Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg) gefärbt (siehe dazu 2.3.2)

### Lösungen:

- A) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung: 30 g Acrylamid, 0,8 g Bis-(N,N'-Methylendiacylamid ad 100 ml H<sub>2</sub>O ; filtriert durch 0,2  $\mu$ m Filtermembran
- B) Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4% SDS
- C) Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,6; 0,4% SDS
- D) 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)
- E) Elektrophoresepuffer: 3,0 g Tris, 14,4 g Glycin, 1 g SDS add 1 l H<sub>2</sub>O, pH8,8

Tabelle : Zusammensetzung der Gele (Angaben in ml)

	Trenngel							Sammel- Gel
Lösung	5,0%	7,0%	8,0%	10,0%	11,0%	12,5 %	15,0%	
A	5,0	7,0	8,0	10,0	11,0	12,5	15,0	1,3
B	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	C: 2,5
H <sub>2</sub> O	17,9	15,2	14,4	12,4	11,3	9,9	7,4	7,4
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
D	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Probenvorbereitung

Die Proteinproben aus Bakterien- und HeLa-Zellaufbereitungen sowie FPLC-Fraktionen, wurden mit einer entsprechenden Menge SDS-Probenpuffer für 5 Minuten zur Denaturierung gekocht und anschließend entweder direkt auf ein Polyacrylamidgel geladen oder zur Aufbewahrung eingefroren. Das Ladevolumen betrug 8–15 µl pro Tasche. Der Proteinstandard (Sigmamarker: *Low molecular weight range*, siehe 2.1.11) wurde kurz mit den Proben zusammen aufgeköcht.

Probenauftragung und Durchführung

Nach Entfernen des Kammes wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, die einzelnen Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült und die Proben aufgetragen. Als Standard wurden 3,0-5,0 µl Molekulargewichtsmarker (6,5-66 kDA, siehe 2.1.11) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V für das Sammelgel und 120 V für das Trenngel. Wenn die Lauffront das Gelende erreicht hatte, wurde das Gel entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau R250 gefärbt (siehe 2.3.2) oder zum immunochemischen Nachweis auf Nitrozellulose transferiert (siehe 2.3.4)

**2.3.2 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung R250**

Coomassie-Brilliant-Blau R250 wird zur Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen verwendet. Es ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der im sauren Milieu recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine bindet. Die Proteine werden zugleich im Gel durch Essigsäure fixiert. Der überschüssige Farbstoff

wird nach erfolgter Färbung durch 12,5%ige Essigsäurelösung entfärbt. Die Nachweisempfindlichkeit liegt je nach Farbstoffbindevermögen der Proteine in einem Bereich von 100 ng – 2 µg.

Färbelösung:    5 g        Coomassie-Brilliant-Blau R250  
                      900 ml    Methanol abs.  
                      185 ml    Eisessig  
                      ad 2 l     H<sub>2</sub>O

Entfärbelösung: 1 l        Methanol abs.  
                      1,5 l     Eisessig  
                      ad 20 l    H<sub>2</sub>O

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel entnommen, 30 Minuten bei RT in der Färbelösung gefärbt und anschließend in der Entfärbelösung bei RT entfärbt, bis der Hintergrund ausreichend klar und die Banden gut sichtbar waren.

### **2.3.3 Protein-Transfer auf Nitrozellulose (Western-Blotting)**

Der Western-Blot oder auch Immuno-Blot besteht aus dem Transfer von Proteinen aus einer Polyacrylamidmatrix auf eine Nitrozellulosemembran und der anschließenden Detektion des Proteins durch einen Antikörper (Immundetektion siehe: 2.5.2). Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteine auf die Nitrozellulose transferiert und dort immobilisiert.

Zum Transfer wurde das Gel auf die mit Transferpuffer angefeuchtete Membran gelegt und zwischen je drei Lagen mit Transferpuffer getränktes 3-MM-Whatmanpapier in den mit saugfähigen Plastikmatten gefütterten Kammereinsatz gesteckt. Der Transfer erfolgte für 30 Minuten bei 333V und 6°C. Die Proteinbanden konnten anschließend mit Ponceau-S-Lösung reversibel gefärbt werden. Überschüssige Färbelösung wurde durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O entfernt.

Transferpuffer:	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1%
	Methanol	20,0%

### 2.3.4 Expression von rekombinanten Proteinen

10-20 ml 2x YTA-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit einer einzelnen rekombinanten BL-21-Kolonie angeimpft und über Nacht inkubiert.

198 ml 2x YTA-Medium (100µg/ml Ampicillin) wurden mit 2 ml der ÜN-Vorkultur angeimpft und unter Schütteln (250 upm) inkubiert. Die Expression des rekombinanten Proteines wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM bei einer  $OD_{600} = 1,2$  induziert. Nach erfolgter Induktion wurde für weitere 4 Stunden unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 x g für 20 Minuten geerntet. Die Pellets wurden sofort wie unter 2.3.6 beschrieben weiter bearbeitet oder zur vorübergehenden Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.3.5 Präparation eines Lysates aus *E.coli*

Die Bakterien wurden aus 200- bis 500-ml-Kulturen im GSA-Rotor bei 5500 upm geerntet. Das Resuspendieren der Pellets erfolgte in 5-10 ml PBS, in dem zuvor eine Protease-Inhibitor-Tablette (Complete, Mini, EDTA-free; Roche, Mannheim) aufgelöst worden war. Je 20 ml Bakteriensuspension wurden zwei "freeze-thaw"-Zyklen unterzogen. Im Anschluss wurden sie sechsmal in 30-sekündigen Intervallen sonifiziert und auf Eis abgekühlt. Zu je 20 ml Zellhomogenat wurden 1 ml einer 20%igen Triton X-100-Lösung gegeben und für 1 h überkopf-rotierend bei  $6^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 1 bis 2 Zentrifugationen bis zu je 45 Minuten bei 11 000 upm im SS-34-Rotor, wurde der Überstand durch eine  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ -Membran filtriert. Das Protein war nun soweit aufbereitet, dass es konstruktgemäß weiter aufgereinigt werden konnte.

Um die Löslichkeit der Proteine zu bestimmen, wurden im Vorfeld aus 2x 500 µl der induzierten Bakterienkultur Proben für einen Western Blot erstellt. Vergleichend wurde die Menge des Proteins im Gesamtzellpellet eines Aliquots mit den Mengen im Überstand und Sediment eines analogen Aliquots im Western Blot betrachtet. Dazu

wurden die Zellen bei 13 000 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Ein Gesamtzellpellet wurde direkt in 240 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf Eis gehalten. Das Pellet des zweiten Aliquots wurde in 200 µl Lysispuffer (20 mM Natriumphosphat, 500 mM Natriumchlorid, pH 7,8) aufgenommen. Beide Aliquots wurden 3x für 10 s sonifiziert. Die Lysis-Fraktion wurde nochmals zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die löslichen Proteine im Pellet die unlöslichen. Der Überstand wurde mit 40 µl 6x SDS-Probenpuffer versetzt und das Pellet in 240 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben konnten nun einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen werden.

### **2.3.6 Reinigung von nativem GST-Fusionsprotein**

Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein 26 kDA Protein, welches Glutathion bindet. Proteine, die durch einen entsprechenden Expressionsvektor mit GST fusioniert sind, können in löslicher Form über GST als Fusionspartner an ein glutathionhaltiges Säulenmaterial gebunden werden. Durch eine Thrombin-Erkennungssequenz unmittelbar zwischen GST- und Ziel-Protein kann der GST-Teil des Fusionsproteins durch die Thrombin-Protease abgespalten und das rekombinante Protein mit einem authentischen N-Terminus von der Säule eluiert werden.

Durchführung: Die Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) (500 µl für circa 3 mg Protein) wurde vorbereitend mit PBS + 1% Triton X-100 gewaschen. Das aus der Bakterienkultur isolierte Protein-Gemisch (siehe oben) wurde für 1 Stunde bei 6°C mit der Glutathion-Sepharose 4B nach Herstellerangaben kopfüber-drehend inkubiert und anschließend in eine Leersäule geladen. Nach 10 Waschgängen mit je 10 ml PBS folgte ein Thrombin-Verdau für 24-45 Stunden bei RT mit 100U Thrombin-Protease/ml Glutathion-Sepharose 4B. Die Elution wurde mit 10 ml oder 20 ml PBS in 1-ml- oder 2-ml-Fractionen durchgeführt. Je 30 µl (bzw. 20 µl) der Fractionen wurden für eine analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese entnommen und mit 10 µl 4x SDS-Probenpuffer (beziehungsweise 4 µl 6x SDS-Probenpuffer) gemischt. Nach Identifikation der Zielprotein tragenden Fractionen wurden diese vereint und zum Zweck der weiteren Aufreinigung einer Dialyse unterzogen.

### 2.3.7 Dialyse

Die Dialyse von Proteinlösungen wurde durchgeführt, wenn für nachfolgende Techniken andere Puffersysteme nötig waren.

Dazu wurden Dialyseschläuche Spektra/Por (Spektrum Medial Industries, Los Angeles, USA) vor Gebrauch gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Die Dialyse der probaten Proteinlösungen erfolgte ÜN bei 6°C unter langsamem Rühren gegen 500-1000 Volumina des gewünschten Puffers. Zwei Stunden nach Beginn der Dialyse wurde der Puffer erneuert.

### 2.3.8 Ionenaustausch-Chromatographie

Protein-Lösungen aus Affinitäts-Chromatographien wurden, nachdem sie dialysiert worden waren, einer weiteren Reinigung, der Ionenaustausch-Chromatographie, unterzogen. Dabei konkurriert das Proteinmolekül mit Salz-Ionen um die geladenen Positionen auf einer Ionenaustauscher-Matrix. Für basische Proteine ( $pI > 8$ ) wurde eine Anionenaustauschersäule, Mono-Q-Säule (Pharmacia) verwendet. Die Proteine wurde mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration (20 mM NaCl) an die Säule gebunden und durch einen steigenden, linearen Salzgradienten (bis 0,5 M NaCl) gemäß ihrer Ionenstärke von der Säule verdrängt. Auf diese Weise werden Proteine mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften voneinander getrennt.

Für die Ionenaustausch-Chromatographie wurde das “*FPLC*” System (“*Fast Protein Liquid Chromatography*“) der Firma Amersham Pharmacia Biotech bei 7°C verwendet. Mit Hilfe der Pumpeinheit (P500) wird der Niedrigsalz-Puffer gegen den Hochsalz-Puffer langsam ausgetauscht, die Elution mit einem Durchflussphotometer (LKB Unicord S2) photometrisch bei 280 nm bestimmt und mit einem Schreiber dokumentiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1,5 ml mit einem Fraktionssammler (Frac-100) aufgefangen. Je 30 µl der proteinhaltigen Fraktionen wurden mit je 10 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für ein Polyacrylamid-Gel vorbereitet (siehe dazu 2.3.1). Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereint und gegebenenfalls mit “Centricon Centrifugal Filter Devices” (Millipore) nach Herstellerangaben aufkonzentriert.

### 2.3.9 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde die Faustregel herangezogen, dass  $OD_{280} = 1$  einer Proteinkonzentration in der Lösung von 1 mg/ml entspricht. Bei GST-Fusionsproteinen gilt:  $OD_{280} = 1$  entspricht 0,5 mg/ml.

### 2.3.10 Massenspektroskopie

Für die Bestimmung der Masse eines Proteins wurden eine Protein-Probe von 1  $\mu$ l (0,2–1,0 mg/ml) mit der Matrix (= gesättigte Lösung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in 30% Acetonitril und 0,1% TFA) gemischt und auf das “Maldi-Target” aufgetragen. Nachdem die Probe bei RT getrocknet worden war, wurde sie zweimal mit 0,1% TFA gewaschen und anschließend wieder getrocknet. Danach wurde die Messung im linearen Modus mit dem Maldi Massenspektrometer, Typ Kratos Kompact Maldi 4, durchgeführt.

### 2.3.11 Aminosäure-Sequenzanalyse

Die N-terminale Ansequenzierung von gereinigten rekombinanten Proteinen erfolgte durch den Edman-Abbau (EDMAN UND BEGG, 1967) mit einem automatischen Gasphasen-Sequenator (Perkin Elmer Applied Biosystems, Überlingen, Modell 491) und nachfolgender Analyse der freigesetzten Phenylthiohydantion-Derivate der abgespaltenen Aminosäuren.

### 2.3.12 Rotationsbedampfung

Um die Symmetrie des Molekülkomplexes eines Proteins und deren Strukturbeziehungsweise Strukturunregelmässigkeit zu analysieren, wurde das Protein mit Rotationsbedampfung für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Bei der Rotationsbedampfung werden die isolierten Proteine auf einen Objekträgern absorbiert und direkt mit einer Platin/Kohle-Mischung (Pt/C) unter einem geringen Bedampfungswinkel und anschließend mit Kohlenstoff (C) senkrecht bedampft. Während der Beschichtung wird das Objekt auf einem Rotationsdrehtisch mehrfach gedreht.

Die Rotationsbedampfung wurde wie folgt ausgeführt: 50  $\mu$ l einer 1 mg/ml Proteinlösung wurden 2 Stunden lang gegen 20 mM Tris, pH 7,5; 80 mM NaCl; 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT mikrodialysiert (Filterplättchen von Millipore 0,02  $\mu$ m). Die Proteinlösung

wurde 1:2 mit 60% Glycerin gemischt und anschließend im Stickstoffstrom auf frisch gespaltene Glimmerplättchen gesprüht. Dann wurde die Probe mit Pt/C unter einem Winkel von  $3,5^\circ$  rotationsbedampft und im Anschluss mit der Bedampfungsanlage (Balzer, BAE 120) senkrecht auf einen Kohlenstofffilm aufgetragen. Der Kohlenstofffilm konnte mit  $\text{H}_2\text{O}$  flotiert, mit Kupferplättchen ( $400 \text{ Maschen/cm}^2$ ) aufgenommen und nach Lufttrocknung im Transmissionselektronenmikroskop (Phillips, CM12) betrachtet werden.

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

### **2.4.1 HeLa-Zellkultur**

Die humane Zelllinie HeLa SS6 wurde bei  $37^\circ\text{C}$  und 7%  $\text{CO}_2$  in einer wassergesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% fetalem Kälberserum und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) gehalten und alle drei Tage umgesetzt.

### **2.4.2 Ernte von HeLa-Zellen**

Die Zellen wurden entsprechend ihrer weiteren Verwendung geerntet. Siehe dazu für Western Blot-Proben 2.4.3 und für die Elektronenmikroskopie 2.4.8

### **2.4.3 Zytoskelettpräparation aus HeLa-Zellen**

Subkonfluente Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 1 Minute in Zytoskelettbuffer A bei RT extrahiert. Die extrahierten Zellen wurden dann einmal mit dem Zytoskelettbuffer A ohne Triton X-100 gewaschen und anschließend in demselben Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei  $12\,000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet in heissem SDS-Probenpuffer aufgenommen, sonifiziert und für 5 Minuten gekocht.

Zytoskelettbuffer A:

- 10 mM Tris-Cl
- 140 mM NaCl
- 5 mM EDTA
- 25  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol, pH auf 7,6
- 1 % Triton X-100
- ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$



#### **2.4.4 Transfektion von HeLa-Zellen**

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in DMEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum) und ohne Antibiotikazusätze in 24-Loch-Platten (je 500 µl Suspension) oder 2-ml-Schalen entsprechend der gewünschten Konfluität von 30–80% bei Transfektion ausgesät. Sollten die Zellen einer Immunfluoreszenz (siehe 2.5.1) unterzogen werden, wurden sterile Objektträger in die Schalen gelegt, auf denen sich die Zellen abgesetzt hatten. Die Fixierungen erfolgte individuell nach 24 bis 96 Stunden.

##### Transfektion mit Plasmid-DNA

Die Transfektionen von HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA wurden in 24-Loch-Platten und 2-ml-Schalen ausgeführt. Als Transfektionsagens wurde in den meisten Fällen mit Polyfect (Qiagen) und in einigen Fällen mit Lipofectamin 2000 (Gibco) gearbeitet. Beide Transfektionsagenzien vermitteln die Aufnahme der DNA durch Bildung eines DNA-Liposomen-Komplexes. Die Verwendung erfolgte streng nach Herstellerangaben, wobei das Verhältnis von DNA zum Transfektionsagens in einzelnen Fällen variierte. Für die Ausführung der Transfektion mit Polyfect in 24-Loch-Platten wurden analog zur Verwendung von 2-ml-Schalen den Zellen mit 350 µl frischem Medium 0,4 µg DNA und 3 µl Polyfect in einem Endvolumen von 183 µl zugegeben. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen zu 30–40% (Polyfect) oder zu 70–80% (Lipofectamin 2000) konfluent.

##### Transfektion durch Elektroporation

Die Zellen wurden drei Tage vor der Elektroporation in 75 m<sup>2</sup>-Flaschen und DMEM mit 10% FCS und Antibiotika so ausplattiert, dass die Schale am dritten Tag konfluent war. Für die Elektroporation von fünf Küvetten mit je circa  $5 \times 10^6$  Zellen wurden zwei Flaschen benötigt. Nachdem das Medium aus einer Flasche abgenommen worden war, wurden die Zellen einmalig mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit dem gleichen Volumen 37°C-warmem Trypsin (0,1% Trypsin, 0,5 mM EDTA, pH 7,8 in PBS) trypsinisiert. Die Zellsuspension wurde in 10 ml eiskaltem OptiMEM I

aufgenommen und für 5 Minuten bei 2000 upm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde in eiskaltem PBS resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Nachdem die Zellen in einem definierten (z.B. 1 ml) Volumen OptiMEM I aufgenommen worden waren (500 µl enthalten etwa  $5 \times 10^6$  Zellen) wurden 20 µg DNA gelöst in 800 µl OptiMEM I zugegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Elektroporation bei 260 V und 950 µF. Danach wurde sofort 1 ml vorgewärmtes DMEM zu den Zellen in die Küvette gegeben und mit 10 ml DMEM + FCS und Antibiotika in 10 ml-Schalen plattiert. Sobald die Zellen sich auf dem Untergrund abgesetzt hatten (nach 5-6 Stunden), wurde das Medium erneuert. Die Zellen konnten nach 48 Stunden fixiert werden.

#### Transfektion mit siRNAs

Die Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNAs wurde ausschliesslich in 24-Loch-Platten ausgeführt. Pro Ansatz wurden 3 µl einer 20 µM siRNA-Duplex-Lösung (60 pmol) mit 50 µl OptiMEM I (Gibco) gemischt. In einem weiteren Gefäss wurden 3 µl Oligofectamin (Gibco) mit 12 µl OptiMEM I vorsichtig gemischt und für 5-10 Minuten bei RT inkubiert. Die beiden Lösungen wurden zur Bildung des Liposomen-Komplexes vereint und durch Umschwenken vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei RT wurde durch Zugabe von 32 µl OptiMEM I das Volumen auf 100 µl adjustiert. Diese 100 µl Liposomen-Komplex-Lösung wurden auf die Zellen (in 500 µl Kulturmedium) gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Kulturschalen verteilt.

#### **2.4.5 “TUNEL”-Test**

Der “TUNEL”-Test diente dazu, die Apoptoserate von HeLa –Zellen zu ermitteln. Im Zuge der Apoptose entstehen DNA-Fragmente mit geringem Molekulargewicht ebenso wie Einzelstrang-Brüche (“nicks”) in größeren DNA-Segmenten. Die dabei freiwerdenden 3’-OH Enden werden mit Fluorescein-gekoppelten Nukleotiden markiert. Katalysierendes Enzym ist die Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT), die Template-unabhängig die Polymerisation der Fluorescein-gekoppelten Nukleotide an die freien 3’OH-Enden bewirkt (TUNEL-Reaktion). Derartig markierte DNA-Fragmente können im Fluoreszenz-Mikroskop detektiert werden.

Die Durchführung erfolgte mit dem “*In situ cell death kit*” der Firma Roche. Vorbereitend wurden 450 µl Fluorescein- mit 50 µl Enzym-Lösung gemischt. Nachdem die Zellen 6 Minuten mit –20°C kaltem Methanol fixiert worden waren, wurden sie nach kurzem Waschen in PBS für zwei Minuten in eiskalter Na-Citrat/Triton-Lösung (0,1% Na-Citrat, 0,1% Triton X-100 in H<sub>2</sub>O) auf Eis inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden 20–30 µl der Fluorescein/Enzym-Lösung auf die mit Zellen bestückten Deckgläser gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Bevor die Zellen in Mowiol 4.88 (Hoechst) eingedeckt wurden und unter dem Mikroskop betrachtet werden konnten, wurden sie für 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen.

#### **2.4.6 Hitzeschock**

HeLa-Zellen, welche das mutierte Lamin A-Konstrukt trugen, sollten auf die Fragilität ihrer Zellkerne hin untersucht werden. Dazu wurden Zellen-tragende Deckgläser zügig in 45°C heisses Medium, welches zuvor in einem Wasserbad innerhalb eines Brutschrankes erhitzt worden war, überführt und dort für 30 oder 60 Minuten belassen. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit –20°C kaltem Methanol fixiert und konnten im weiteren Verlauf mittels Immunfluoreszenz oder “TUNEL”-Test analysiert werden.

#### **2.4.7 Überprüfung der Teilungsfähigkeit und Morphologie transfizierter Zellen *in vivo***

Die Teilungsfähigkeit einer transfizierten Zelle kann Aufschluss über den Einfluss des transfizierten Konstruktes auf die Zelle und Tochterzellen geben. Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen aus 2-ml-Schalen mit 400 µl TE (0,1% Trypsin, 0,5 mM EDTA, pH 7,8 in PBS) trypsinisiert und sofort mit 500 µl DMEM + FCS versetzt. Nach zwei Zentrifugationsschritten für je 4 Minuten und 1000 upm bei 17°C wurden die Zellen in 500 µl DMEM + FCS aufgenommen und in Verdünnungen von 1:20 bis 1:160 in 2-ml-Schalen auf Deckgläsern mit Gritt (CELLLocate, Eppendorf, Hamburg) ausplattiert. Ausgewählte Zielgruppen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden unter dem Lichtmikroskop (Modell: IM 35, Zeiss) fotografiert und unmittelbar nach der letzten Fotoaufnahme wie unter 2.5.1 beschrieben immunfluoreszent gefärbt.

### **2.4.8 Proteinvorbereitung für die Elektronenmikroskopie**

Die Zellen wurden auf ihren Deckgläsern in Glutaraldehyd (2% in 0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,2; 0,1 M Sucrose) für 45 Minuten bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten mit Na-Cacodylat (0,1 M, pH 7 + 0,1 M Sucrose) und einmaligem kurzen Spülen in destilliertem Wasser folgte die Fixierung mit Osmiumtetroxid (2% in 0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,2; 0,1 M Sucrose). Die Vorkontrastierung erfolgte ÜN bei 4°C in Uranylacetat (1% in H<sub>2</sub>O), der sich die Dehydrierung in Serien zunehmender Ethanolkonzentration (50%, 70%, 80%, 90%, 96%) bei 4°C, gefolgt von je zweimaliger Inkubation in 100% Ethanol und Propylenoxid für je 15 Minuten bei RT anschloss. Zur Einbettung wurden die Zellen zunächst in 1:1 Epon/Propylenoxid und anschließend zweimal für 3 Stunden in Epon belassen. Nach der Polymerisation des Epons wurden die Deckgläser vom Block entfernt und die Proben parallel zur Blockoberfläche mit dem Ultramikrotom (Reichert OmU3, Leica) mit einem Diamantmesser geschnitten. Die Schnitte wurden auf Kupferträger aufgezogen und zunächst für 10 Minuten bei RT in Uranylacetat (5% in Methanol) und dann für 1,5 Minuten in Pb-Citrat bei RT kontrastiert.

## **2.5 Immunologische Methoden**

### **2.5.1 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden Antigene (Zielmoleküle/Proteine) in einzelnen Zellen durch spezifische primäre Antikörper lokalisiert. Die Antigen-Antikörper-Bindung ist sehr stabil und sehr spezifisch. Ein fluoreszierender Farbstoff (Fluorochrom) ist an einen sekundären Antikörper gekoppelt, welcher den Protein spezifischen Antikörper auffindet. Das Fluorochrom wird mit Licht bestimmter Wellenlänge im Fluoreszenzmikroskop angeregt und emittiert wiederum Licht im sichtbaren Spektrum, das durch selektive Filter zum Betrachter gelangt.

Für die Immunfluoreszenz müssen die Zellen zunächst auf ihrem Untergrund, dem Deckgläschen fixiert und für den Antikörper permeabilisiert werden. Dies erfolgte mit den folgenden Fixierungsmethoden:

## Fixierungen

### Methanolfixierung:

In den meisten Fällen wurde eine Methanolfixierung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen behafteten Objektträger in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltes Methanol überführt und für 6 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für 5 Minuten wurde der erste Antikörper auf die Zellen gegeben.

### Formaldehydfixierung:

Die Zellen behafteten Objektträger wurden in warmem PBS ( $37^{\circ}\text{C}$ ) für 2 Minuten gewaschen und anschließend in 3,7% Formaldehyd in PBS für 20 Minuten fixiert. Nach einem weiteren kurzen Waschschrift wurden die freien Aldehydgruppen mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS (3 x 5 Minuten) abgesättigt und mit PBS analog der Absättigung gewaschen. Es folgte die Zugabe des ersten Antikörpers.

### Weitere Verfahrensweise:

Nach der Fixierung wurden 10–20  $\mu\text{l}$  des 1. Antikörpers auf die Zellen/Deckglas gegeben und für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Antikörper waren zuvor mit Puffer P (0,5 mg/ml BSA, 0,02%  $\text{NaN}_3$  in PBS) wie benötigt verdünnt worden. Drei kurzen Waschschriften mit PBS für je 5 Minuten folgte die Zugabe und Inkubation mit 10–20  $\mu\text{l}$  des 2. Antikörpers für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Dann wurde erneut in drei Waschgängen gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entweder einer “Hoechst”-Färbung unterzogen oder in Mowiol 4.88 eingebettet. Sie wurden mit einem Zeiss Axiophot Photomikroskop analysiert und zur Dokumentation auf Kodak T-Max 400 Film fotografiert oder mit der Digitalkamera aufgenommen und der “MetaMorph Imaging Software” (Universal Imaging Corporation) bearbeitet.

## “Hoechst”-Färbung

Die Behandlung von Zellpräparaten mit “Hoechst”-Farbstoff färbt das Chromatin der Zellen, sodass es im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Dazu wurden die fixierten Zellen für 4 Minuten mit Hoechst 33342 (Hoechst) (1  $\mu\text{M}$  in PBS) bei RT inkubiert und vor dem Einbetten in Mowiol 4.88 dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen.

### 2.5.2 Detektion von Proteinen durch Antikörper (Immunoblot)

Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran (siehe 2.3.3) wurden freie Bindungsstellen mit 4% BSA oder 5% Milchpulver (Becton Dickinson, Sparks, USA) in TBS(T) abgestättigt. Anschließend wurde die Nitrozellulose mit TBS(T) gewaschen, bevor die Zugabe des ersten Protein spezifischen Antikörpers für 1,5 Stunden bei 37°C erfolgte. In einigen Fällen wurde zur Standardisierung ein Antikörper gegen ein weiteres Protein zusammen mit dem ersten Antikörper inkubiert. Als Standard-Antikörper wurde dann der V9 Vimentin-Antikörper eingesetzt. Dann wurde die Membran ein weiteres Mal mit TBS(T) gewaschen. Die Antikörperrnachweisreaktion des/der 1. Antikörper/s erfolgte mit dem “*ECL Western blotting analysis system*” (Amersham Pharmacia Biotech, ECL=*enhanced chemiluminescence*). Diese sehr sensitive Nachweismethode beruht auf der Umsetzung von Wasserstoffperoxid durch die an den 2. Antikörper gekoppelte Peroxidase, welche die Oxidation von Luminol unter Lichtemission katalysiert. Die Inkubation der Membran mit diesem 2. Peroxidase gekoppelten Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper wurde für 45 Minuten in TBS(T) mit 5% Milchpulver durchgeführt. Nach drei Waschgängen wurde die Membran entweder auf einen Röntgenfilm (Kodak, XAR-5) aufgelegt, der an den Stellen der Lichtemission belichtet wird und somit den Antikörper lokalisiert, oder mit einem LumiImager (Boehringer Mannheim, Mannheim) gescannt und mit der Software LumiAnalyst Version 3.0 ausgewertet. Die Membran konnte im Anschluss mit dem “Western blot recycling kit” (Chemicon International, Temecula, USA) regeneriert und ein “*reblot*” durchgeführt werden.

TBS(T):            100 ml 10 x TBS  
                      20 ml 10% Tween (Sigma)  
                      ad 1000 ml

## 2.6 Liste der verwendeten Primer

Nr.	Name	Sequenz 5' → 3'
1	K62	<u>GGA TTC</u> GCA CGC ACT AGC GGG CGC GTG GCC GTG G
2	K63	<u>CTC GAG</u> TTA CTC AAC CAC AGTCAC TGA GCG CAC CAG CTT GC
3	K66	GTC GAC GCA AGC GCT CAG CGC GGA GTG AAG CGT CG
4	K67	CTC GAG TTA CAT GAT GGA ACA ACG ATC GGC TGG
5	LMNA FL S	GGA TTC ATG GAG ACC CCG TCC CAG CGG
6	LMNA FL AS	CTC GAG TTA CAT GAT GCT GCA GTT CTG GGG
7	M465 S	GGA CCA GTC CAT GGA CAA TTG GCA GAT CAA GC
8	M465AS	GCT TGA TCT GCC AAT TGT CCA TGG ACT GGT CC
9	M482 S	CCT TGC TGA CTT ACC TGT TCC CAC CAA AGT TC
10	M482AS	GGA CTT TGG TGG GAA CAG GTA AGT CAG CAA GG
11	M527 S	GGG AAC AGC CTG CCT ACG GCT CTC ATC AAC
12	M527AS	GTT GAT GAG AGC CGT AGG CAG GCT GTT CCC
13	LMNA 105 S	GGA TTC GGG TGG GGG CAG CGT CAC CAA AAA GCG
14	LMNA 105 AS	CTC GAG TTA CTC AAC CAC AGT CAC TGA GCG CAC CAG C
15	K100	CAG GAG CCC AGG TGG GTG GAC CCA TCT CCT CTG
16	K101	CAG AGG AGA TGG GTC CGC CCA CCT GGG CTC CTG
17	K98	GAA TTC ATG GAG ACC CCG TCC CAG CGG CGC GCC ACC
16	K99	CTC GAG CTG GGC TCC TGA GCC GCT GGC AGA TGC C
18	K103	GAA TTC ATG GAG ACC CCG TCC CAG CGG CGC GCC
19	K108	GCA GTT CTG GGG GCT CTG GGC TCC TGA GCC GCT GGC AGA TGC C
20	K110	CTC GAG TTA CAT GAT GCT GCA GTT CTG GGG GCT CTG GGC TCC TGA GC
21	RT_A/Cs	CAG GAG CTC AAT GAT CGC TTG
22	RT_A/Cas	GCA TCA CCG AGT CTG AAG AGG T

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die globuläre Lamin-Schwanz-Domäne

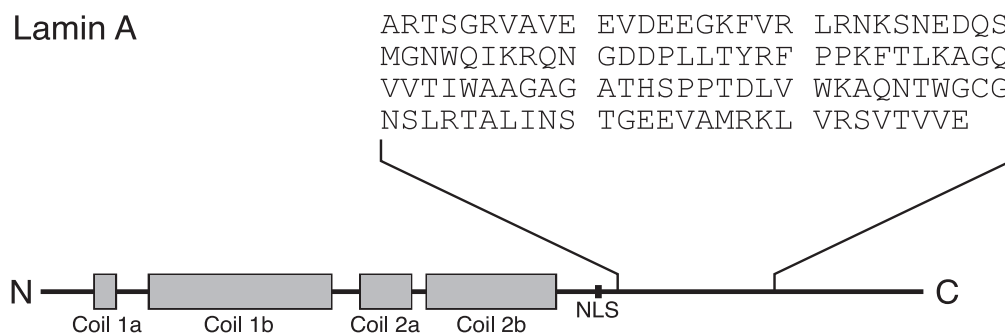
Das Ziel war es die globuläre Schwanzdomäne des humanen Lamin A/C und des einzigen Lamins von *Caenorhabditis elegans* (Ce-Lamin) für eine Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie zu klonieren und aufzureinigen. Die globuläre Morphologie der Lamin A/C-Domänen war bereits durch Elektronenmikroskopie ermittelt worden (STUURMANN et al. 1998).

Die Konstrukt-Erstellung und Proteinaufreinigung wird im folgenden beschrieben:

##### 3.1.1 Humanes Lamin A/C

###### Sequenzbereich:

Für die Kristallisation wurde der Abschnitt AS434 bis AS551 (Medline: 86118697 und 86313596) der carboxyterminalen globulären Domäne des Lamin A/C-Gens (LMNA) ausgewählt, woraus sich ein Polypeptid von 118 AS Länge ergibt (Skizze 1).



Skizze 1: Schematische Darstellung des humanen Lamin A. Die vier Balken symbolisieren die  $\alpha$ -helikalen Coiled-coil-Domänen. Der für die Kristallisation ausgewählte Bereich ist durch Angabe der Aminosäuresequenz angegeben. NLS = Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*)

###### Klonierung:

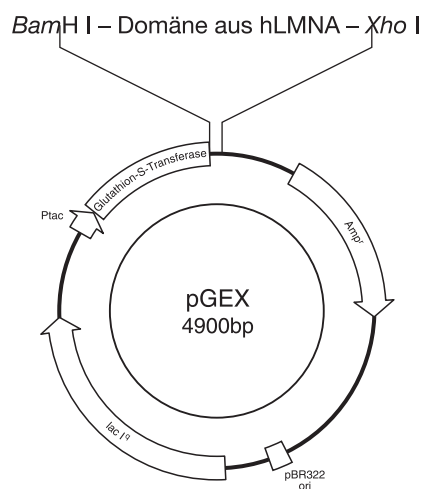
Die beschriebene Domäne wurde für die Aufreinigung in zwei Expressionssysteme kloniert:

1. His<sub>6</sub>-Tag-System
2. GST-Gen-Fusions-System



In Probeexpressionen wurde deutlich, dass das GST-Konstrukt gut löslich, das His<sub>6</sub>-Tag-Konstrukt nicht gut löslich ist. Daher wurde die Expression und Aufreinigung mit dem GST-Konstrukt durchgeführt, dessen Erstellung näher beschrieben werden soll.

Als Expressionsvektor diente der pGEX-4T-1-Vektor (Skizze 2). Hier wurde der aus dem Lamin A/C-Gen stammende Sequenzabschnitt zwischen die Schnittstellen *Bam*H I und *Xho* I eingefügt, wobei sich der *Bam*H I-Schnittstelle am 5'-Ende unmittelbar die Spaltstelle für die Vektor ständig kodierte Thrombin-Protease anschloss.



Skizze 2: Schematische Darstellung des pGEX-Expressionsvektors in vereinfachter Form. Das Fragment wurde zwischen die *Bam*H I- und die *Xho* I-Schnittstelle des Vektors inseriert. Die *Bam*H I-Schnittstelle schliesst sich unmittelbar an die Sequenz für den Fusionspartner GST (Glutathion-S-Transferase) an. Die Thrombin-Protease schneidet exakt zwischen Fusionspartner und *Bam*H I-Schnittstelle. *Amp*<sup>r</sup>, Ampicillinresistenz-Gen, *lac* I<sup>q</sup>, Gen des lac Repressors, ori pBR322, Replikationsursprung für *E.coli*, *Ptac*, *tac*-Promotor

Der zu klonierende Abschnitt wurde in einer PCR (2.2.1.10) amplifiziert. Als Templat diente ein aus vorhergegangenen Arbeiten stammendes Plasmid mit einer für LMNA kodierenden cDNA, welches in Mengen von 50 ng in einem 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt wurde. Durch den *sense*-Primer (K62) wurde die *Bam*H I-Schnittstelle, durch den *antisense*-Primer (K63) die *Xho* I-Schnittstelle eingeführt. Die PCR wurde mit einer “Annealing”-Temperatur von 65°C und einer Elongationszeit von 30 Sekunden durchgeführt. Nach der Klonierung des PCR-Produktes in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor, erfolgte die Umklonierung über *Bam*H I und *Xho* I in den pGEX-4T-1-Expressionsvektor.

### Aufreinigung:

Das erstellte GST-Konstrukt wurde in *E.coli* BL-21-Zellen exprimiert (2.3.4). Nach Präparation des Zell-Lysates (2.3.5) aus 5 Litern Bakterienkultur wurde das GST-Fusionsprotein auf eine Glutathion-Sepharose-Säule geladen. Zur Abspaltung der Domäne durch Thrombin-Protease wurde mit derselbigen für 24 Stunden inkubiert und anschließend in 9 Schritten á 1,5 ml eluiert. Deutliche Präsenz zeigt das abgespaltene Protein in den ersten 4 Fraktionen (Abbildung 1), welche für die anschließende Dialyse vereint wurden.

Mit 118 Aminosäuren + 2 weiteren Aminosäuren (GS) aus der verbleibenden *BamH* I-Schnittstelle hat das Protein ein theoretisch berechnetes Molekulargewicht von 13 186,8 Dalton, welches sich im späteren Verlauf massenspektroskopisch bestätigte.

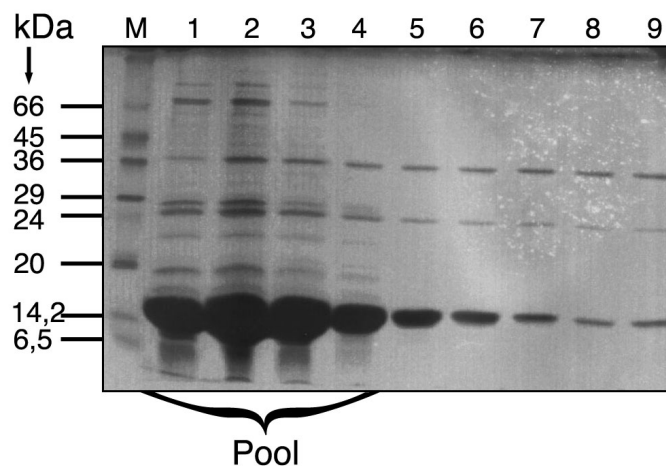


Abbildung 1: SDS-PAGE der Elutions-Fractionen der Glutathion-Säule. Je 20 µl des Eluats wurden mit 4 µl 6x SDS-Probenpuffer aufbereitet. Pro Tasche und Fraktion wurden je 10 µl der SDS-Probe beziehungsweise 3 µl “low molecular weight”-Marker (M) auf ein 15%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau R250 gefärbt.

Der “Pool” aus den ersten vier Fraktionen der Affinitäts-Chromatographie mit einem Gesamtvolumen von 6 ml wurde gegen 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 80 mM NaCl und 0,5 mM frisch zugesetztem DTT in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze von 3 500 Dalton dialysiert. 80 mM NaCl im Dialysepuffer waren nötig, um ein Ausfallen des Proteins zu verhindern. Dennoch verbleibender Niederschlag

wurde durch Zentrifugation ( $15\,000 \times g$  für 5 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$ ) pelletiert. In einer Reihe von Test-Dialysen wurde die minimal nötige NaCl-Konzentration von 80 mM zur Vermeidung von Präzipitation des Proteins bestimmt.

Das Dialysat wurde einer Ionenaustausch-Chromatographie unterzogen und auf eine Mono-Q-Säule geladen. Die höhermolekularen Verunreinigungen (siehe Abbildung 1) banden an die Säule, wohingegen die Lamin-Domäne im Durchfluss war. Der Durchfluss wurde in 1,0-ml-Fractionen aufgefangen und Aliquots davon auf ein SDS-Gel geladen (Abbildung 2). Das Protein dominiert in den Fractionen 3 bis 6, die zu "Pool 1" vereint wurden.

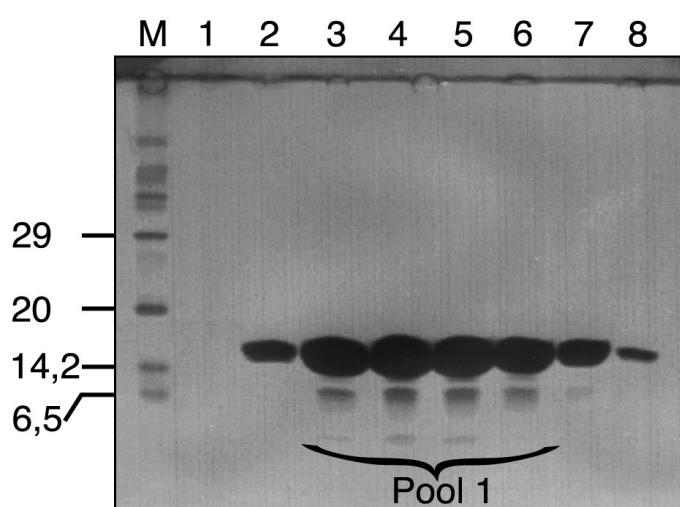


Abbildung 2: SDS-PAGE der Durchfluss-Fractionen der Ionenaustausch-Chromatographie. Dazu wurden je 20  $\mu\text{l}$  Eluat mit 4  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer gekocht. Pro Tasche wurden je 10  $\mu\text{l}$  Probe und 3  $\mu\text{l}$  "low molecular weight"-Marker (M) auf ein 15%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. Das Gel wurde mit Coomassie-Brillant-Blau R250 gefärbt. Die Fractionen 3 – 6 wurden zu "Pool 1" vereint.

Die Konzentration der vereinten Fractionen wurde spektroskopisch mit 2 mg/ml bestimmt (Extinktionskoeffizient = 24 070, 2).

Die massenspektroskopische Analyse des Proteins aus "Pool 1" lieferte einen deutlichen Ausschlag bei 13 185,1 Dalton, was der zuvor berechneten Masse von 13 186,8 Dalton entspricht (Abbildung 3).

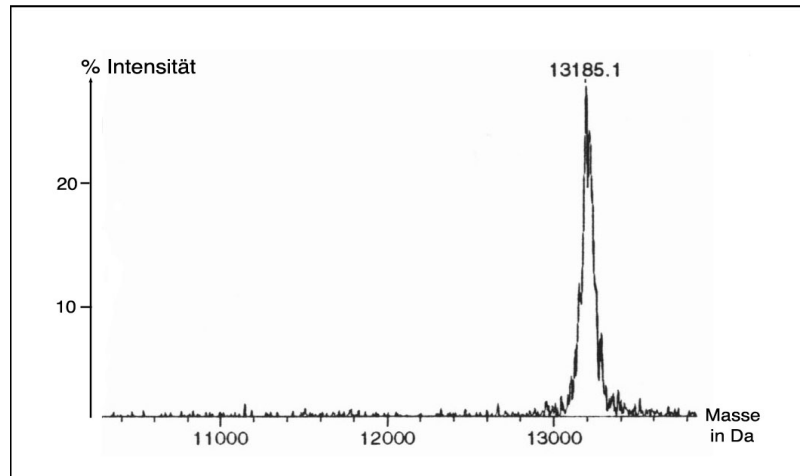


Abbildung 3: Massenspektrogramm der aufgereinigten Domäne nach der Ionenaustausch-Chromatographie. Die Messung wurde mit einer Probe aus “Pool 1” durchgeführt. Für die Masse des Proteins wurde ein Wert von 13 185,1 Dalton bestimmt.

Um näheres über die strukturelle Beschaffenheit der Domäne zu erfahren, wurde eine Probe aus der Ionenaustausch-Chromatographie rotationsbedampft (2.3.12) und unter dem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet (Abbildung 4). Die globuläre Struktur wird hier bestätigt.

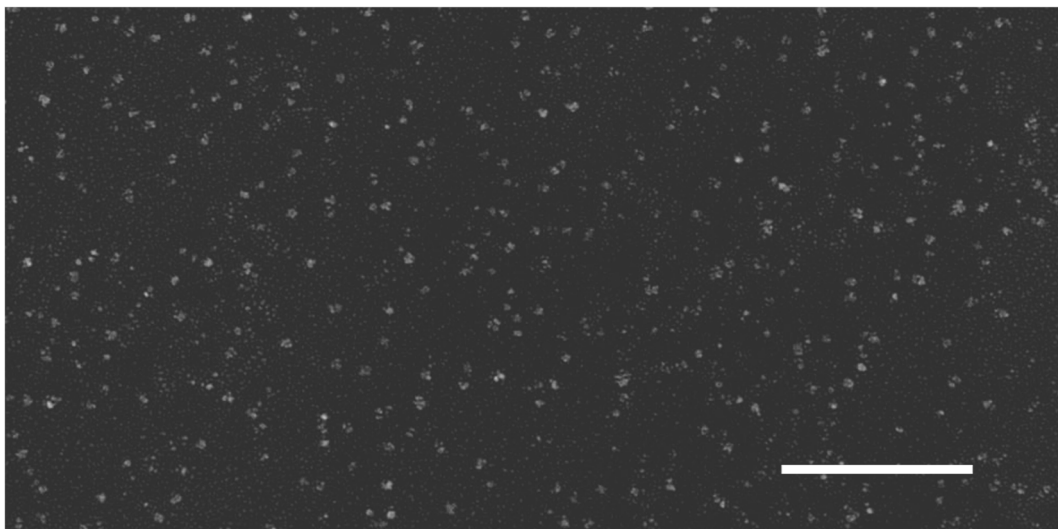


Abbildung 4: Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild der Lamin A-Domäne. Das Protein ist als kompakte Struktur sichtbar. Weisses Balken = 100 nm.

Das Protein war an diesem Punkt in ausreichender Menge und Reinheit vorhanden und konnte für eine Kristallisation eingesetzt werden.

Die Kristallisation sollte in Zusammenarbeit mit Prof. Ueli Aebi (Maurice E. Müller-Institut für Strukturbioogie, Universität Basel) durchgeführt werden, dem zu diesem Zweck eine Probe des Proteins übersandt wurde. Es konnten gute Kristalle der Domäne erzeugt werden.

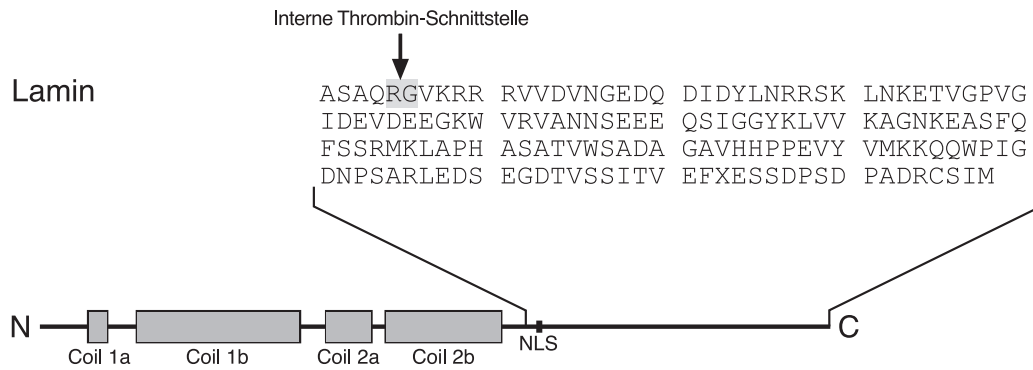
Vor Abschluss der Arbeit wurde bekannt, dass die Strukturaufklärung der Lamin A-Domäne durch Röntgenkristallographie in Kürze von DHE-PAGANON (Joslin Diabetes Center & Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, USA) veröffentlicht werden sollte und auch später in DHE-PAGANON et al. 2002 veröffentlicht wurde. Die Arbeit an der Strukturaufklärung der Domäne wurde deshalb eingestellt. Ein ähnlicher Sequenzbereich (AS411-553) wurde strukturell mittels NMR-Spektroskopie von I. KRIMM und Mitarbeitern (KRIMM et al. 2002) aufgeklärt. Die Domäne hat eine Ig-ähnliche Struktur vom Typ S.

Die Arbeit mit der globulären Schwanz-Domäne des Lamins wurde auf indirekte Weise weitergeführt. Ziel waren es einen zu der humanen Lamin-Schwanz-Domäne homologen Sequenzbereich aus *Caenorhabditis elegans* zu klonieren und zu kristallisieren.

### **3.1.2 Lamin aus *Caenorhabditis elegans***

#### Sequenzbereich:

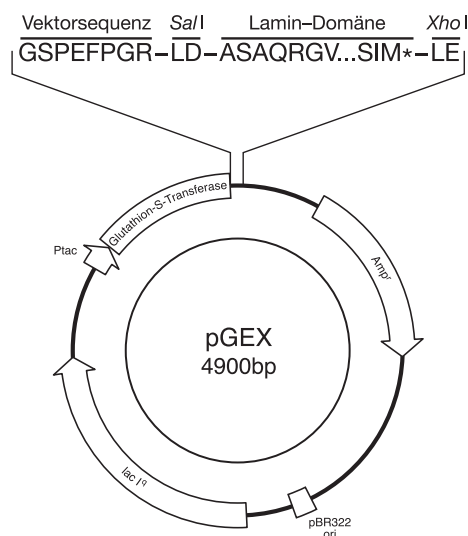
Für die Kristallisation wurde der Abschnitt von AS408 bis zum Sequenzende (AS566) des *C.elegans*-Lamin-Gens (LMN-1) (PubMed 7925480) ausgewählt (Skizze 3). Das resultierende Protein hatte mit 158 AS Länge zuzüglich der 10 Aminosäuren aus der Vektor kodierten Sequenz ein theoretisch berechnetes Molekulargewicht von 18 312,2 Dalton. In dem ausgewählten Abschnitt zwischen AS413 und AS414 befindet sich eine weitere interne Thrombinschnittstelle. Das entsprechende kleinere Protein hat mit 153 AS ein Molekulargewicht von 16 742,4 Dalton.



Skizze 3: Schematische Darstellung des *C. elegans*-Lamins. Die vier Balken symbolisieren die  $\alpha$ -helikalen Coiled-coil-Domänen. Der ausgewählte Bereich für die Kristallisation ist durch Angabe der Aminosäuresequenz angegeben. Der Bereich für die interne Thrombin-Schnittstelle befindet sich zwischen den grau unterlegten Aminosäuren R und G. NLS = Kernlokalisationssignal (*nuclear localisation signal*)

### Klonierung

Das entsprechende Fragment wurde zwischen die *Sal* I- und *Xho* I-Schnittstelle in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 eingefügt (Skizze 4). Die dazugehörige PCR (2.2.1.10) wurde mit dem *sense*-Primer K66 und dem *antisense*-Primer K67 in einem 50  $\mu$ l PCR-Ansatz durchgeführt. Dazu wurden 20 ng eines Plasmids, welches die *C. elegans*-Lamin-cDNA enthielt, bei einer "Annealing"-Temperatur von 60°C und einer Elongationszeit von 30 Sekunden in eine PCR eingesetzt. Katalysierendes Enzym war die *Pfu*-Polymerase. Das resultierende Fragment wurde zunächst in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor kloniert und dann in den pGEX-Vektor umklont. Das molare Vektor/Insert-Verhältnis betrug 1:1.



Skizze 4: Schematische Darstellung des pGEX-Expressionsvektors in vereinfachter Form. Die Lamin-Domäne kodierende DNA-Sequenz wurde zwischen *Sa* II- und *Xho* I-Schnittstelle des Vektors inseriert. Die Thrombin-Protease schneidet unmittelbar hinter GST (Glutathion-S-Transferase). Die abgespaltene Lamin-Domäne enthält folglich N-terminal die Vektor kodierte Sequenz GSPEFPGR LD. *Amp*<sup>r</sup>, Ampicillinresistenz-Gen, *lac* I<sup>q</sup>, Gen des lac Repressors, ori pBR322, Replikationsursprung für *E. coli*, Ptac, *tac*-Promotor

### Aufreinigung:

Das Konstrukt wurde in *E.coli* BL-21-Zellen exprimiert. Das resultierende Zell-Lysat aus 4,5 Litern Bakterienkultur wurde auf eine Glutathion-Sepharose-Säule geladen. Die Abspaltung vom Fusionspartner erfolgte durch Inkubation mit Thrombin-Protease für 40 Stunden auf der Säule. Im Anschluss wurde das Protein in 2-ml-Fractionen eluiert. Dieser Thrombin-Verdau war, wie aus der folgenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Abbildung 5) und einer anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung (Abbildung 6) ersichtlich, nicht ausreichend, um das Protein an seiner internen Schnittstelle vollständig zu verdauen. Als Resultat wurden zwei Proteine unterschiedlicher Größe von der Säule eluiert.

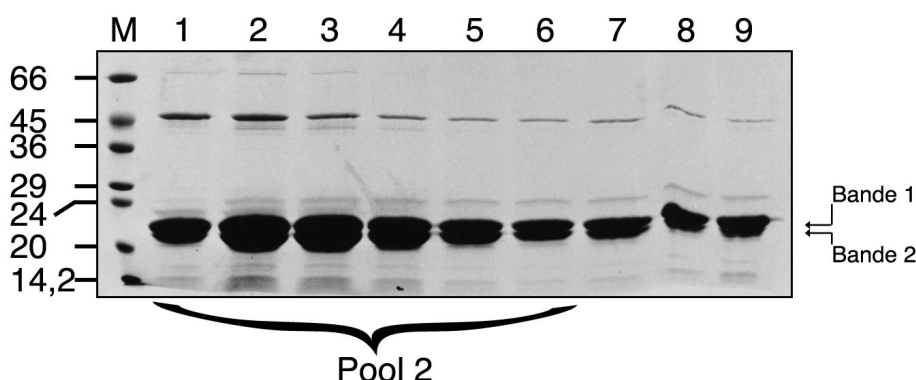


Abbildung 5: SDS-PAGE der Elutions-Fractionen 1 bis 9 der Glutathion-Säule. Je 30 µl des Eluats wurden mit 6 µl 6x SDS-Probenpuffer aufbereitet. Pro Tasche und Fraktion wurden je 10 µl der SDS-Probe beziehungsweise 3 µl "low molecular weight"-Marker (M) auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau R250 gefärbt. Die Fraktionen 1 bis 6 wurden zu "Pool 2" vereint. Das eluierte Protein ist in zwei Banden wiederzufinden, Bande 1 und Bande 2, welche im SDS-Gel höher als erwartet liefen.

Das Proteingemisch wurde einer Massenspektroskopie unterzogen (Abbildung 6) und N-terminal ansequenziert. Das Ergebnis weist auf zwei Proteine mit den Massen 18 467,0 und 16 905,1 Dalton hin. Das Protein, welches in der höher laufenden "Bande 1" (Abb. 5) wiederzufinden ist, beginnt mit der Aminosäuresequenz GSPEFPGRLDASA. Ihm ist die Masse 18 467,0 Dalton zuzuordnen. Die ersten zehn Aminosäuren (G bis D) entstammen dem Expressionsvektor. Dem Protein der "Bande 2" (Abb. 5) ist die Masse 16 905,1 Dalton zuzuordnen. Seine Sequenz beginnt mit den Aminosäuren

GVKRRRVV, welche exakt der Sequenz nach der internen Thrombinschnittstelle entsprechen.

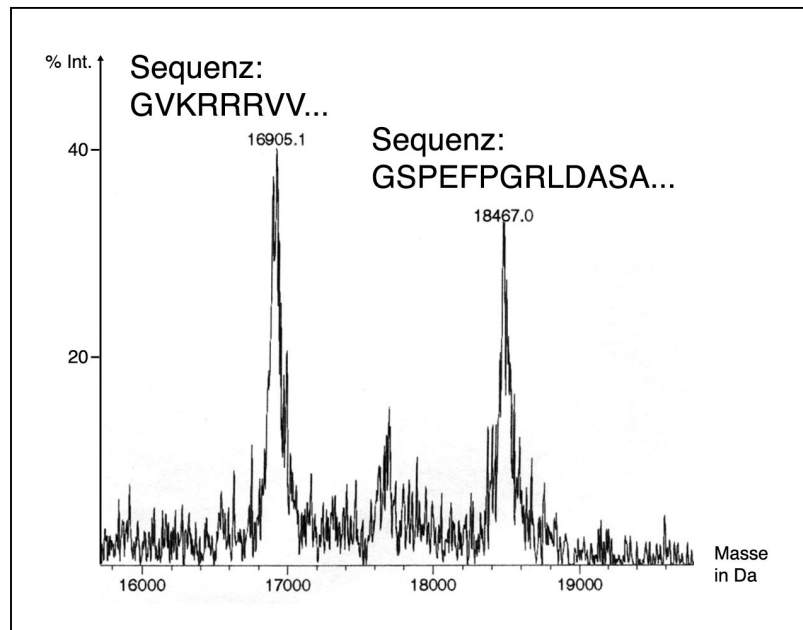


Abbildung 6: Massenspektrogramm einer Proteinprobe aus "Pool 2" nach Elution von der Glutathion-Säule und einem 40-stündigen Thrombin-Verdau. Es sind zwei maßgebliche "Peaks" einer bei 16 905,1 und ein weiterer bei 18 467,0 Dalton zu sehen. Das Protein mit der größeren Masse beginnt mit der Aminosäure-Sequenz GSPEFPGRLDASA, das Protein mit der kleineren Masse mit der Sequenz GVKRRRVV.

Int.=Intensität

Für einen weitere Thrombin-Verdau wurden die ersten 5 Fraktionen in "Pool 2" vereint und mit der doppelten Menge an Thrombin-Protease für weitere 25 Stunden bei RT inkubiert. Alle 4–5 Stunden wurde ein Aliquot entnommen und eine Massenspektroskopie durchgeführt. Nach 22 Stunden war das Protein vollständig verdaut. In der Schreiberaufzeichnung der Massenspektroskopie (Abbildung 7) ist nur noch ein "Peak" bei 16 910 Dalton zu sehen. Das Protein wurde folglich vollständig an der internen Thrombinschnittstelle gespalten.



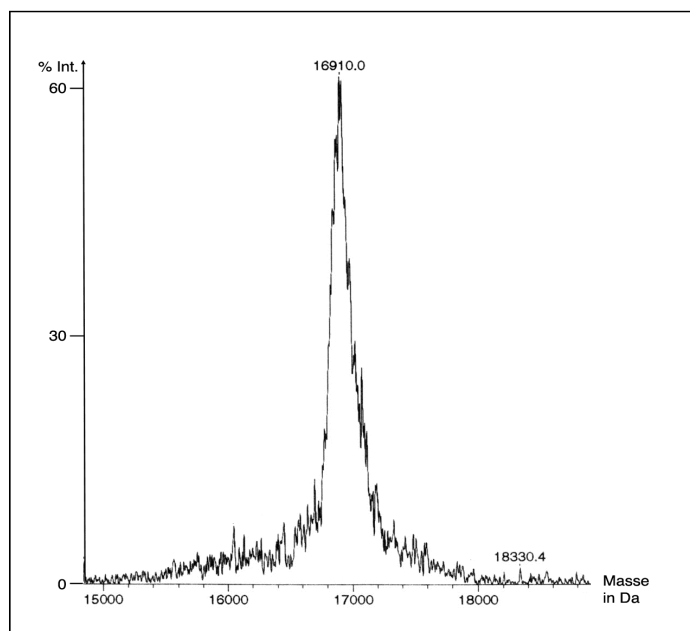


Abbildung 7: Massenspektrogramm der Proteinprobe aus “Pool 2” nach einem zusätzlichen Thrombin-Verdau von 22 Stunden. Es ist nur noch ein “Peak” bei 16 910 Dalton zu sehen. Der zweite “Peak”, wie er in Abbildung 6 zu sehen ist, ist nicht mehr vorhanden. Das Protein ist vollständig verdaut worden. Die Intensität (Int.) ist im Vergleich zu Abbildung 6 um circa 20% gestiegen.

Das Eluat der Affinitäts-Chromatographie, “Pool 2” (Abbildung 5), wurde gegen 20 mM Tris-Cl (pH 7,5), 0,1mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mM DTT und 20 mM NaCl dialysiert und anschließend auf eine Mono-Q-Säule zwecks Ionenaustausch-Chromatographie gegeben. Die Domäne begann bei einer NaCl-Konzentration von 155 mM von der Säule zu eluieren, was den Fraktionen 23–28 (Volumen je 1 ml) entsprach. Es wurde ein weiteres, kleineres Protein eluiert. Es ist auf dem SDS-Gel vor allem in den Fraktionen 29 und 30 unter der Bande der Domäne zu sehen (Abbildung 8). Die restlichen Verunreinigungen waren laut Schreiberaufzeichnung, insofern sie von der Säule verdrängt werden konnten, in den Fraktionen 5 bis 11 oder bereits im Durchfluss zu finden (ohne Abbildung). Die Fraktionen 24 bis 26 wurden in einem Pool vereint. In diesen Fraktionen war die Menge der Verunreinigung durch das zusätzliche Protein niederen Molekulargewichtes im Vergleich zum erwünschten Protein am geringsten.

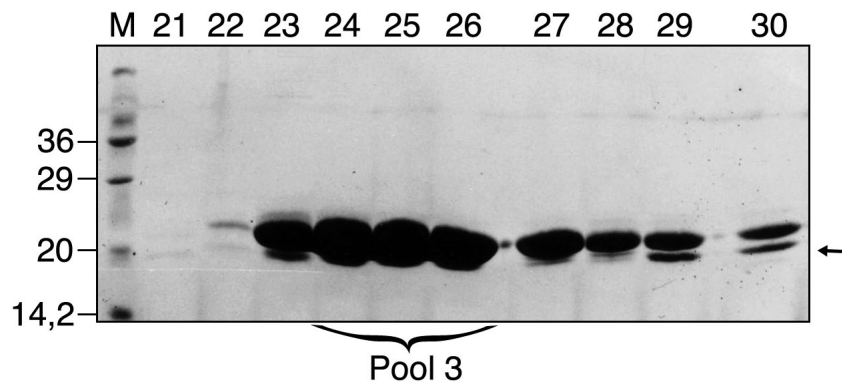


Abbildung 8: SDS-PAGE der Elutions-Fractionen der Ionenaustausch-Chromatographie. Dazu wurden je 30  $\mu$ l Eluat mit 6  $\mu$ l 6x SDS-Probenpuffer gekocht. Pro Tasche wurden je 10  $\mu$ l Probe beziehungsweise 3  $\mu$ l “low molecular weight”-Marker (M) auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. Die Fraktionen 24-26 wurden zu “Pool 3” vereint. Es ist eine weitere Bande (Pfeil) unterhalb der Domäne zu sehen. Das Gel wurde mit Coomassie-Brillant-Blau R250 gefärbt.

Aus der Fraktion 27 wurde die Masse bestimmt (ohne Abbildung). Es gab einen “Peak” bei 16 939, was der Masse der *C. elegans*-Lamin-Domäne entspricht.

Die spektrometrische Bestimmung der Proteinkonzentration in “Pool 3” ergab unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten 20 940 einen Wert von 1,5 mg/ml.

Eine Probe des derart aufgereinigten Proteins wurde zur Kristallisation nach Basel zu Prof. U. Aebi gesandt.

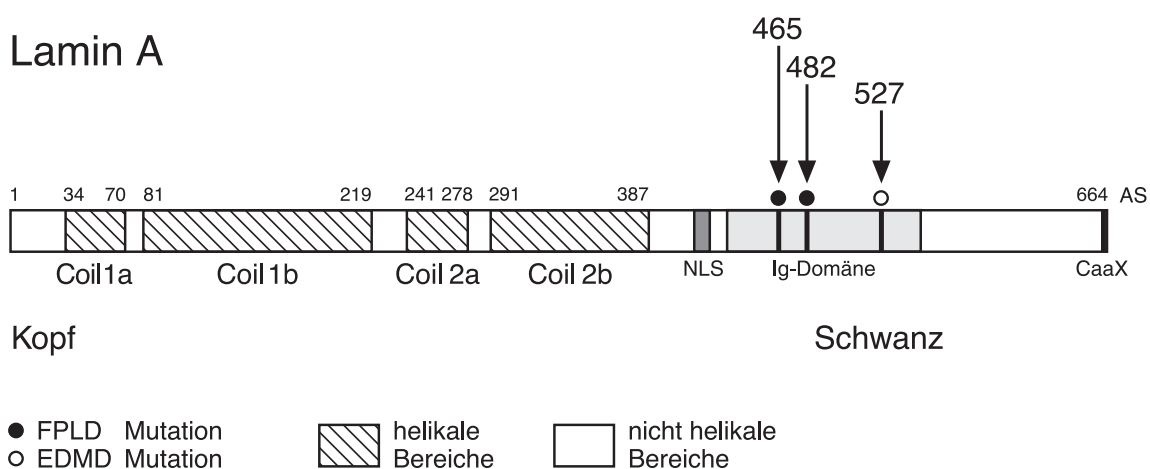
Trotz großer Bemühungen konnten keine messbaren Kristalle erzeugt werden.

### 3.2 Mutationen in LMNA und deren Auswirkungen auf HeLa-Zellen

Im diesem Kapitel werden die Untersuchungen von Mutationen im Lamin A/C-Gens dargestellt, die bei Patienten mit der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD), Partielle Familiäre Lipodystrophie, Dunnigan-Typ (FPLD) und der Progeria infantum gefunden wurden.

#### 3.2.1 Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) und Partielle Familiäre Lipodystrophie, Dunnigan-Typ (FPLD) – Die Mutationen G465D, R482L und R527P in LMNA

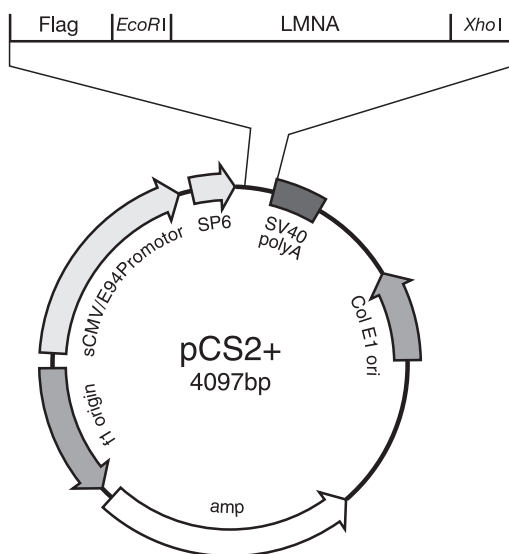
Es galt die Auswirkungen der Mutationen G465D, R482L und R527P in humanem Lamin A/C-Gen zu untersuchen. Dazu wurden die entsprechenden Mutationen in Plasmid ständiges LMNA eingeführt (siehe dazu Skizze 5). Die probaten Konstrukte inklusive des Konstruktes, welches den LMNA Wildtyp beinhaltetete, wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Die Auswirkungen des mutierten Lamin As auf die HeLa-Zellen wurden im Vergleich zum Wildtyp-Lamin A unter Berücksichtigung der Überexpression durch den Expressionsvektor betrachtet und analysiert.



Skizze 5: Schematische Darstellung des humanen Lamin As mit 664 Aminosäuren (AS). Die Mutationen G465D, R482L und R527L sind an ihren Positionen im Gen eingezeichnet. Die helikalen Proteinabschnitte (Coils) sind schraffiert dargestellt, die nicht helikalen (Kopf und Schwanz, Linker) sind ohne Muster abgebildet.

### 3.2.1.1 Erstellung des Lamin A-Wildtyp-Konstruktes

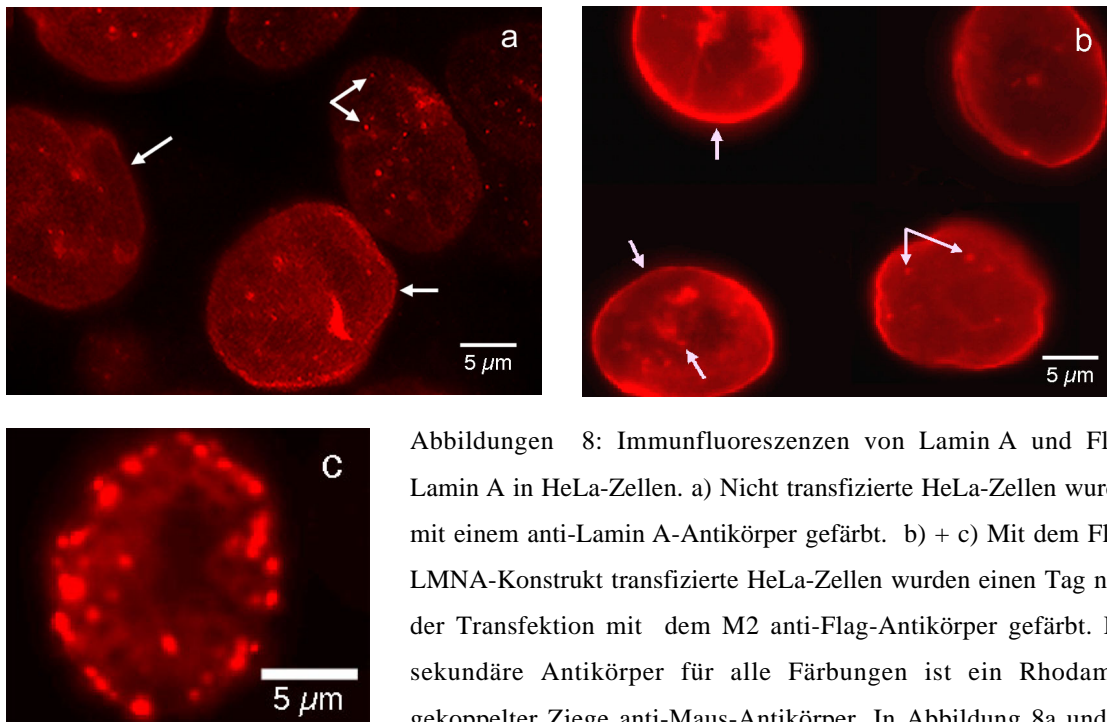
Die LaminA/C-cDNA wurde zunächst in einer PCR (2.2.1.10) amplifiziert. Als “Template” dienten 50 ng eines Plasmides, welches die LMNA kodierende cDNA enthielt. Der Sequenz spezifische 5’Primer, LMNA FL S (Sequenz siehe 2.6), besaß zusätzlich eine *EcoR* I-Schnittstelle, der sequenzspezifische 3’-Primer, LMNA FL AS (Sequenz siehe 2.6) eine zusätzliche *Xho* I-Schnittstelle. Um den Leserahmen einzuhalten wurde zwischen die *EcoR* I-Schnittstelle und das 5’-Ende des Lamin A/C-Gens eine zusätzliche Base gesetzt. Die PCR wurde mit einer “Annealing”-Temperatur von 60°C und einer Elongationszeit von 2.00 Minuten mit der *Taq*-Polymerase durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt wurde in den pCS2+(Flag)-Vektor kloniert. Dieser Vektor besitzt unmittelbar vor der *EcoR* I-Schnittstelle die Sequenz für das Flag-Epitop. Das von diesem Vektor aus exprimierte Protein besteht sodann aus LaminA und einem N-terminalen Flag-Epitop (Skizze 6).



Skizze 6: Schematische Darstellung des pCS2+-Vektors. Das Lamin A/C-Gen (LMNA) wurde unmittelbar hinter die Sequenz für das Flag-Epitop zwischen die Schnittstellen *EcoR* I und *Xho* I eingesetzt. SP6 = SP6-Promotor, *amp*, Amicillinresistenz-Gen, SV 40 polyA, Polyadenylierungssignal, ColE1 ori, Replikationsursprung für *E. coli*

Das Wildtyp-Konstrukt wurde in HeLa-Zellen transfiziert (2.4.4). Nach ein und zwei Tagen wurden die Zellen mit Methanol und Formaldehyd (2.5.1 Fixierungen) fixiert und einer Immunfluoreszenz unterzogen. Zur Detektion des Lamin A-Proteins wurde der M2 anti-Flag-Antikörper eingesetzt, welcher das Flag-Epitop am N-terminalen Ende von Lamin A erkennt. Es zeigte sich, dass das erstellte Konstrukt sowohl für die Expression von Lamin A als auch für den Nachweis durch den anti-Flag-Antikörper geeignet war.

Der Vergleich mit einer Lamin A-Färbung nicht transfizierter HeLa-Zellen (Abbildung 8a) verdeutlicht dieses: Das Flag-Lamin A-Protein zeigte, unter Berücksichtigung der Überexpression, eine für Lamin A typische Verteilung (Abbildung 8b). Es lag ringförmig unter der inneren Kernmembran, regelmäßig verteilt im Kernplasma und als feine Pünktchen im Kern vor, wenn auch die Anlagerung unter der inneren Kernmembran vermehrt und die “Pünktchen-Verteilung” geringer ist als in nicht transfizierter HeLa-Zellen. In einer Minorität der Zellen bildet das Flag-Lamin A im Kern Aggregate (Abbildung 8c).



Abbildungen 8: Immunfluoreszenzen von Lamin A und Flag-Lamin A in HeLa-Zellen. a) Nicht transfizierte HeLa-Zellen wurden mit einem anti-Lamin A-Antikörper gefärbt. b) + c) Mit dem Flag-LMNA-Konstrukt transfizierte HeLa-Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion mit dem M2 anti-Flag-Antikörper gefärbt. Der sekundäre Antikörper für alle Färbungen ist ein Rhodamin-gekoppelter Ziege anti-Maus-Antikörper. In Abbildung 8a und 8b

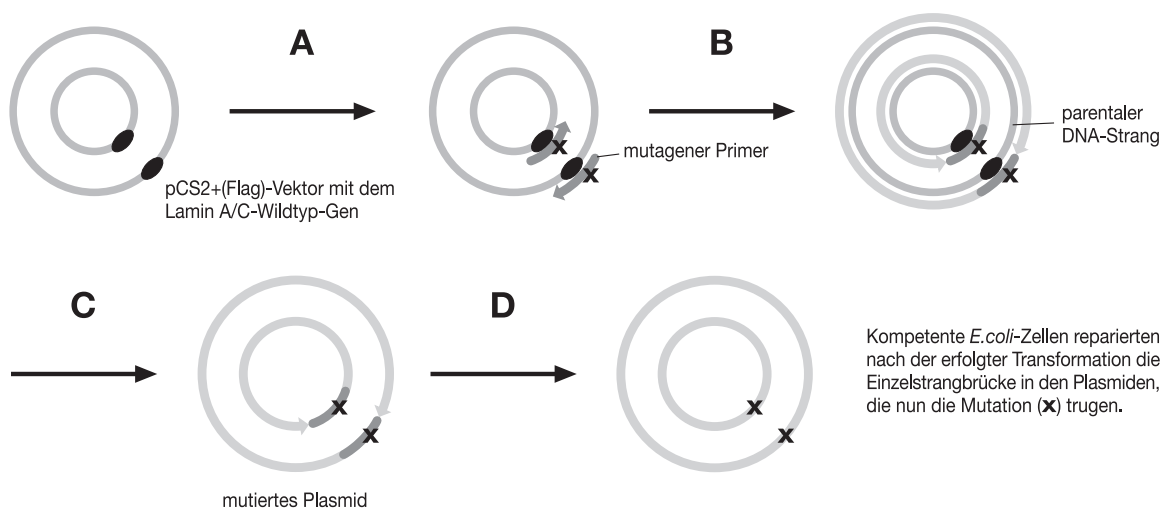
sieht man Lamin A und Flag-Lamin A im Kerplasma verteilt, unter der inneren Kernmembran angeordnet (Pfeile) und als kleine “Pünktchen” im Kern (Pfeile). In Abbildung 8b sind nur vereinzelte Pünktchen in den Zellkernen zu sehen. In Abbildung 8c bildet das Flag-Lamin A im Zellkern zu Aggregate.

Bei den parallel durchgeführten Methanol- und Formaldehydfixierungen erwies sich die Methanolfixierung als die geeignetere. Die Form der Zellkerne, wiedergespiegelt durch die Anordnung des Lamin A-Wildtyp Proteins, erschien bei der Formaldehydfixierung riffelig, und im Vergleich zu denen der Methanolfixierung sehr faltig (ohne Abbildung).

Fortan wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Als Transfektionsagens wurde Polyfect (2.4.4 Transfektion mit Plasmid-DNA) eingesetzt.

### 3.2.1.2 Einführung der Mutationen G465D, R482L und R527P in das Lamin A-Wildtyp-Konstrukt

Die Einführung der Mutationen in LMNA erfolgte wie unter 2.2.1.11 beschrieben mit Mutagenese PCR (Skizze 7).



- A** Denaturierung und Anlagerung der Primer (→), welche die entsprechende Mutation (X) enthielten.
- B** Durchführung der Temperatur-Zyklen zur Extension der Primer und Einführung der Mutationen. Es entstehen zirkuläre DNA-Stränge mit einem Einzelstrangbruch am Ort des Nukleotidaustausches.
- C** Das methylierte parentale DNA-Template wurde durch *Dpn I* abgebaut.
- D** Transformation

Skizze 7: Schematische Darstellung des Quik-Change Mutagenese-Prinzips.

Es handelt sich um Punktmutationen, deren Nukleotid- und der daraus resultierende Aminosäureaustausch in Tabelle 2 dargestellt sind. Die entsprechenden Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben entworfen (2.2.1.11) und sind in Tabelle 2 den Mutationen zugeordnet.

Betroffene AS	AS-Austausch von → nach	Nukleotidaustausch in der DNA-Sequenz	Verwendete Oligonukleotide	
			5'-Primer	3'-Primer
465	G → D	GGC → GAC	M465 S	M465 AS
482	R → L	CGG → CTG	M482 S	M482 AS
527	R → P	CGT → CCT	M527 S	M527 AS

Tabelle 2: Auflistung der in LMNA eingeführten Mutationen mit deren zugehörigen Nukleotid-beziehungsweise Aminosäuraustauschen sowie der zugehörigen Primer. Die Primersequenzen sind in Abschnitt 2.6 aufgelistet.

### 3.2.1.3 Arbeiten mit den Lamin A-Wildtyp- und Mutanten-Konstrukten

#### Bestimmung der Phänotypen

Die Lamin A-Konstrukte (Wildtyp und Mutanten) wurden parallel in HeLa-Zellen transfiziert (2.4.4) und Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Die Fixierung erfolgte mit Methanol nach ein und zwei Tagen.

Nach genauerer Betrachtung manifestierte sich ein Phänotyp, der hier als Phänotyp 1 bezeichnet werden soll. Er war sowohl in Wildtyp- als auch in Mutanten-Zellen zu finden. Bei diesem Phänotyp schloss sich der überwiegende oder der gesamte Teil des exprimierten Lamin A zu Aggregaten/Punkten beziehungsweise sogenannten “nuclear foci/aggregates” zusammen. Sowohl das Ausmaß an exprimiertem Lamin A, welches in den Aggregaten wiederzufinden war, als auch dessen Größe divergierte. Es gab sämtliche Zwischenformen: von Zellen mit kleinen Punkten und einem großem Anteil von Lamin A, welches regelmäßig im Zellkern verteilt und als Lamin A-typische ringförmige Verteilung in der Zellkernperipherie vorlag (Abbildung 10a), bis hin zu Zellen, in denen das Lamin A ausschließlich in Punkten wiederzufinden war. Der Rest des Zellkerns war dunkel und seine Form ließ sich nur noch durch die Anordnung der Aggregate/Punkte erahnen (Abbildung 10b). Auf die Größe der Aggregate wird unter 3.2.1.6 genau eingegangen. Beim Wildtyp-Konstrukt war der Anteil der Zellkerne, wie sie in Abbildung 10b zu sehen sind, geringer als dieses bei den Mutanten der Fall war.

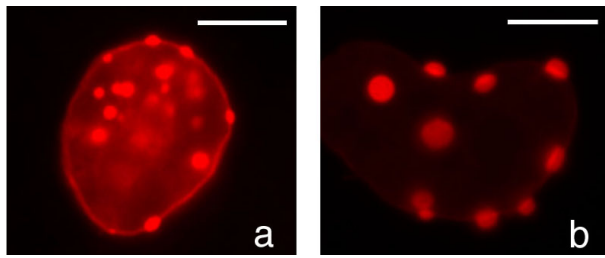


Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung von verschiedenen Ausführungen des Phänotypen 1 in HeLa-Zellen. Die Zellen sind mit dem Flag-Wildtyp-Konstrukt (a) und mit dem G465D-Mutanten-Konstrukt (b) transfiziert worden. Die Immunfluoreszenz wurde mit dem M2

Anti-Flag-Antikörper durchgeführt. Sekundärer Antikörper war ein Rhodamin-gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper. In Abbildung (a) ist das Flag-Lamin A im Zellkernplasma, peripher als ringförmige Anordnung und in Aggregaten zu finden. In Abbildung (b) befindet sich sämtliches Flag-Lamin A in den Aggregaten. Der Rest des Zellkerns ist dunkel. Weißer Balken = 6 µm

#### Andere Phänotypen:

Neben dem oben erwähnten Phänotyp 1 gab es noch eine Reihe anderer Phänotypen, die eine abnormale Flag-Lamin A-Anordnung zeigten. Einige der auffälligsten sind in Abbildung 11 abgebildet. Hier lag das Flag-Lamin A in unförmigen Aggregaten oder Netzen (11A), um den Zellkern herum angeordnet im Zytoplasma (11B), als ein unregelmäßiges, großmaschiges Netz (11C), als eine dicke Schicht vermutlich unter der inneren Kernmembran mit dicken Strängen (11D), an nur einem Pol der Zelle (11E), als Ringe und 'Schnipsel' innerhalb des Kerns (11F) und aggregiert im Zytoplasma (11G) vor.

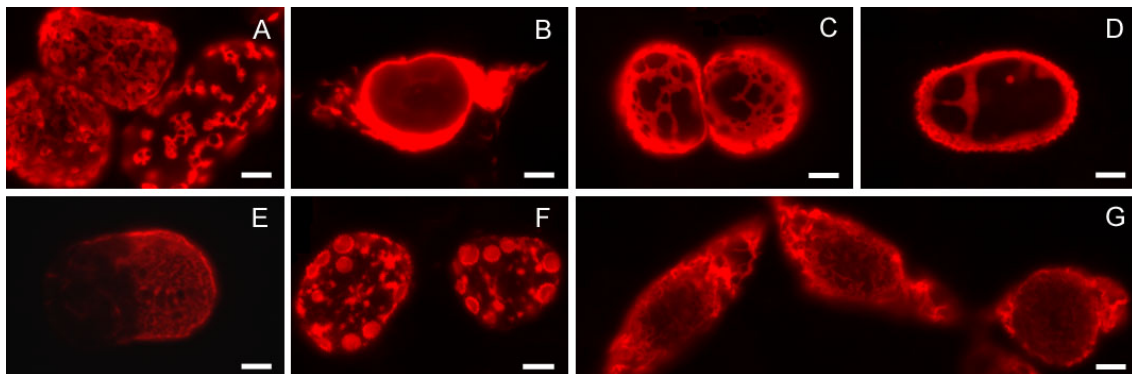


Abbildung 11: Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen, die mit dem G465D-Konstrukt transfiziert worden waren. Erster und zweiter Antikörper waren der M2 Anti-Flag-Antikörper und ein Rhodamin-gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper. Flag-Lamin A-Anordnungen, wie sie in den Abbildungen zu sehen sind, konnten teilweise ebenfalls in Zellen, welche mit Wildtyp-cDNA transfiziert worden waren, gefunden werden. Weiße Balken in den Abbildungen jeweils = 3 µm



Aufgrund des geringfügigen Vorkommens der in Abbildung 1 gezeigten Phänotypen sind diese nicht in die weitere Auswertung miteinbezogen worden.

#### **3.2.1.4 Auszählung des Phänotyp 1**

Es fiel auf, dass die Präparate von HeLa-Zellen, die nach zwei und dann auch nach drei Tagen fixiert worden waren, mehr Zellen aufwiesen, die Flag-Lamin A-Aggregate besaßen als die, welche nach einem Tag *post* Transfektion fixiert worden waren. Dies galt sowohl für HeLa-Zellen, welche mit dem Wildtyp- als auch mit den Mutanten-Konstrukten transfiziert worden waren.

Die Zellen wurden daraufhin in mehreren Versuchen ein, zwei, drei und vier Tagen nach Transfektion fixiert und die Anzahl der Zellen, deren Zellkerne Flag-Lamin A-Aggregate hatten, zu jedem Fixierungszeitpunkt gezählt. Die Auszählung wurde an Wildtyp- und Mutanten-Zellen, die parallel transfiziert worden waren, durchgeführt. Die Anzahl der Zellen, die den Phänotyp 1 zeigten nahm in Abhängigkeit von der Zeit signifikant zu. Allerdings war die Zunahme der Zellen beziehungsweise Zellkerne, die Flag-Lamin-Aggregate trugen, beim Wildtyp deutlich geringer als bei den Mutanten.

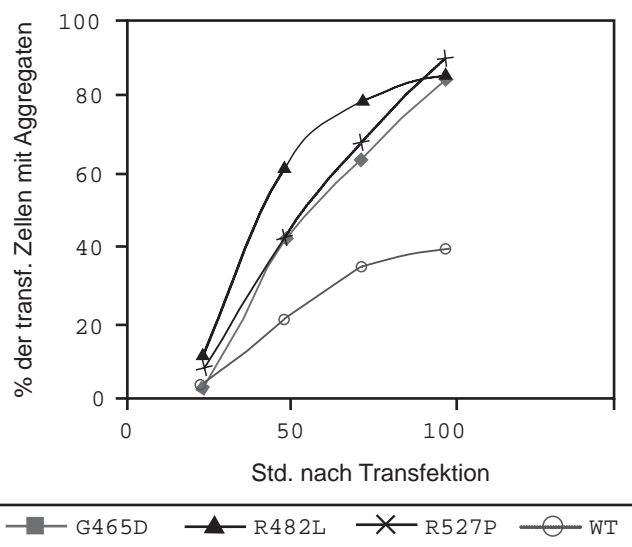
Die Ergebnisse eines Versuches sind exemplarisch in Tabelle 3 aufgelistet und in Skizze 8 graphisch aufgetragen worden. Hier wurde die Prozentzahl der Zellen, die Aggregate aufwiesen, gegen die Zeit beziehungsweise Fixierungszeitpunkte bei 24, 48, 72 und 96 Stunden aufgetragen. Es wurden je 200 Zellen von zwei Personen ausgezählt, wobei den Personen nicht bekannt war, von welchem Zeitpunkt der Fixierung und von welchem Konstrukt sie die Zellen zählten.

So ergab sich für den Wildtyp, vergleicht man den ersten (1 Tag = 24 h) und den letzten Fixierungszeitpunkt (4 Tage = 96 h) eine Zunahme von 1,4 auf 39,8% und beispielsweise bei der Mutante R527P eine Zunahme von 7,5 auf 90,4% (Tabelle 3).

↓Zeit nach ↓Transf.(h)	→→→→→ Konstrukt	Wildtyp	G465D	R482L	R527P
24		1,4	1,2	13,3	7,5
48		21,3	41,0	61,2	42,3
72		34,5	63,0	78,8	68,4
96		39,8	83,8	85,9	90,4

Tabelle 3: Werte der Zählung von transfizierten HeLa-Zellen, die Flag-Lamin A-Aggregate bis zu verschiedenen Fixierungszeitpunkten gebildet hatten (Angaben in %). Gezählt wurden Zellen, die je mit dem Wildtyp- und den drei Mutanten-Konstrukten

transfiziert worden waren. Beim letzten Fixierungszeitpunkt (96 Stunden) ist die Prozentzahl der Zellen mit Aggregaten bei den Mutanten mehr als doppelt so hoch wie beim Wildtyp-Konstrukt.



Skizze 8: Auftragung der Prozentzahl transfizierter HeLa-Zellen, die Flag-Lamin A-Aggregate gebildet hatten gegen den Zeitpunkt der Fixierung (24, 48, 72 und 96 Stunden). Der Kurvenverlauf bei den Mutanten ist wesentlich steiler - etwa um den Faktor 2 - als es beim Wildtyp (WT) der Fall ist.

Weiterhin fiel auf, dass je später die Zellen fixiert worden waren, desto mehr der transfizierten Zellen, die den Phänotyp 1 zeigten, lagerten ihr Flag-Lamin A ausschließlich - wie in Abbildung 10b illustriert - in den Aggregaten an.

Um die drastische Zunahme von Zellen mit Aggregaten bei den Mutanten zu verdeutlichen sind in Abbildung 12a und 12b Ausschnitte von Präparaten abgebildet, welche nach einem (12a) beziehungsweise nach drei (12b) Tagen *post* Transfektion mit dem Mutanten-Konstrukt G465D fixiert und mit dem M2 Anti-Flag-Antikörper gefärbt worden waren.

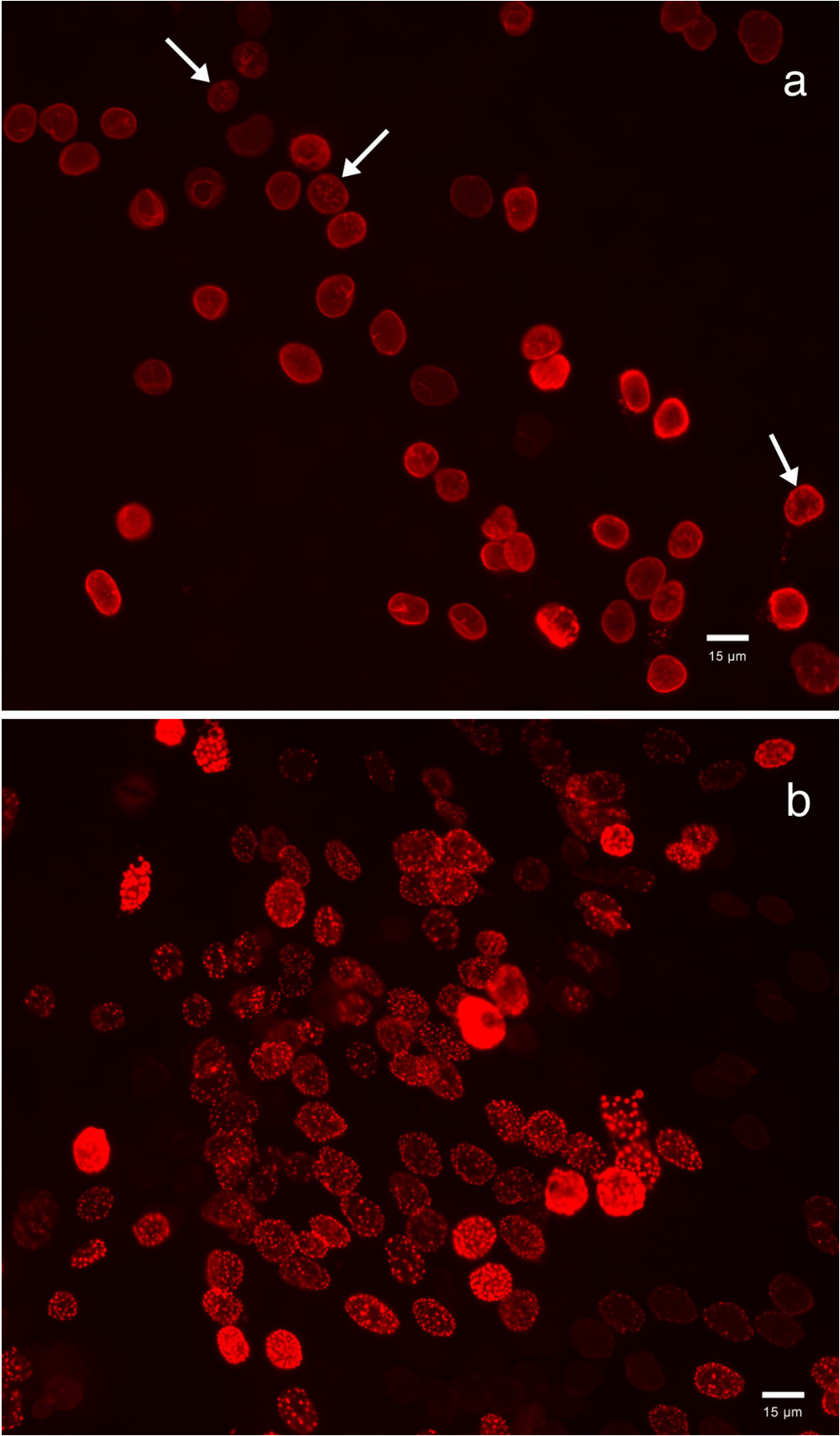


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen, die mit dem Mutanten-Konstrukt G465D transfiziert worden waren. Die Zellen wurden nach einem Tag (a), nach drei Tagen (b) *post* Transfektion fixiert und mit dem M2 Anti-Flag-Antikörper gefärbt worden sind. Die Zunahme der Zellkerne, die Flag-Lamin A-Aggregate haben ist von (a) nach (b) enorm. Die weissen Pfeile deuten auf Zellen mit Aggregaten.

Zur Manifestierung dieser Ergebnisse wurden zwei weitere Zählungen nach 24 und 96 Stunden durchgeführt. Die Werte sind prozentual in Tabelle 4 aufgeführt und stimmen in ihrer Aussage mit den oben dargestellten (Skizze 8) überein. Mittelwert und Standardabweichungen sind für die drei Ausszählungen bei 96 Stunden ebenfalls in Tabelle 4 aufgeführt.

↓ % der transfizierten ↓ Zellen mit Aggregaten	WT	G465D	R482L	R527P
Versuch 1	39,8	83,8	85,9	90,4
Versuch 2	34,8	85,9	76,8	83,2
Versuch 3	47,4	86,9	82,8	84,3
Mittelwert	40,67	85,53	81,83	85,97
Standardabw.	6,34	1,58	4,63	3,88

Tabelle 4: Prozent der mit Wildtyp- und Mutanten-Konstrukte/n transfizierten Zellen mit Aggregaten 96 Stunden nach Transfektion aus dem oben (Tabelle 3, Skizze 8) bereits aufgeführten und zwei weiteren Versuchen. Mittelwerte und Standardabweichungen sind ebenfalls aufgeführt.

listet. Mehr als doppelt so viele transfizierte Zellen, die mit den Mutanten-Konstrukten transfiziert worden waren, besitzen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen Aggregate.

Es wurden 7 weitere Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen mit Wildtyp und Mutanten-Konstrukt transfiziert und nach drei oder vier Tagen fixiert worden waren. Alle Präparate führten zu der gleichen Aussage: Die Mutanten haben etwa doppelt so viele transfizierte Zellen mit Aggregaten wie der (Flag-)Wildtyp.

### 3.2.1.5 Sind Aggregat tragende Zellen apoptotisch?

Um zu untersuchen, ob die Ausbildung des Phänotypen 1 mit Apoptose einhergeht, wurden transfizierte Zellen einem "TUNEL"-Test (2.4.5) unterzogen. 48 Stunden nach Transfektion waren nur 2-5% der gesamten Zellen in der Kultur apoptotisch, was selbst bei einer angenommenen hohen Transfektionseffizienz (TF) von 75% nur noch 0,75-

3,75% der transfizierten Zellen ausmacht. 72 Stunden nach Transfektion erhöhte sich die Apoptoserate auf 8-10%, was sich mit TF = 75% auf 6-7,5% reduziert.

Außerdem konnten betreffend der Apoptoserate keine Unterschiede zwischen sowohl nicht transfizierten als auch Wildtyp-Kulturen und den Mutanten-Kulturen festgestellt werden.

### **3.2.1.6 Genauere Untersuchung der Flag-Lamin A-Aggregate**

Um die Flag-Lamin A-Aggregate in ihrer Beschaffenheit und Lage in den Zellkernen detaillierter zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Präparate (2.4.8) von Zellen 72 Stunden nach der Transfektion angefertigt und unter dem Transmissions-elektronenmikroskop betrachtet und fotografiert.

Aufgrund der Immunfluoreszenz-Färbungen lassen sich über die Anordnung des Flag-Lamin A bereits folgende Aussagen machen:

1. Es lagert sich in den Zellkernen zu runden Aggregaten zusammen.
2. Die Aggregate platzieren sich in der Zellkern-Peripherie und vermutlich im Kernplasma.
3. Je später der Fixierungszeitpunkt der transfizierten Zellen (siehe dazu Absatz 3.2.1.4), desto häufiger lagert sich das Flag-Lamin A in den Aggregaten zusammen.

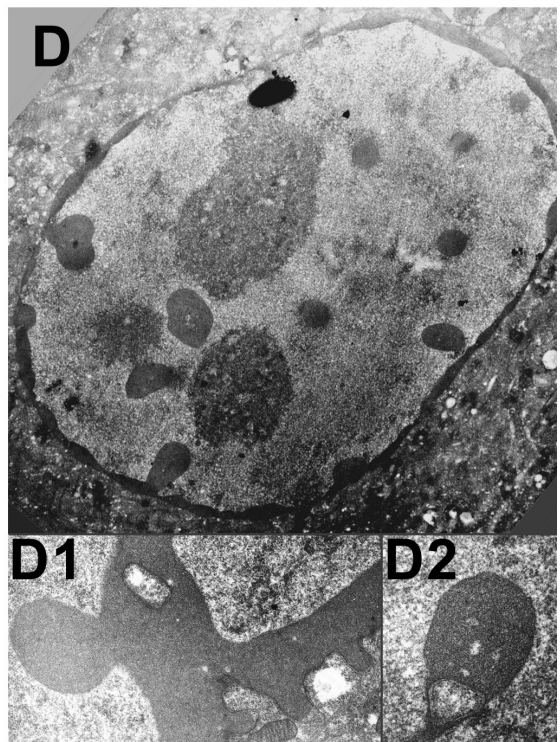
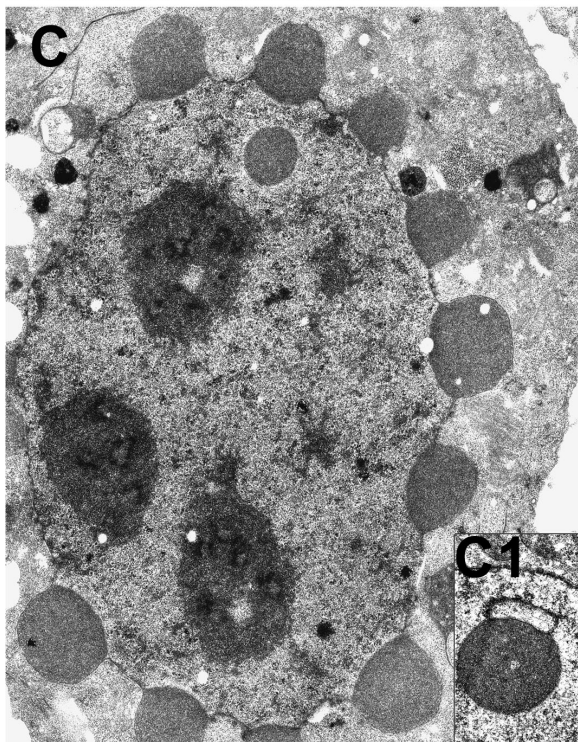
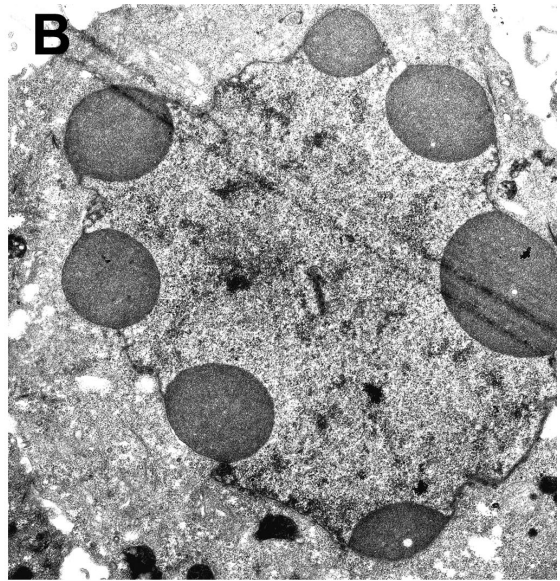
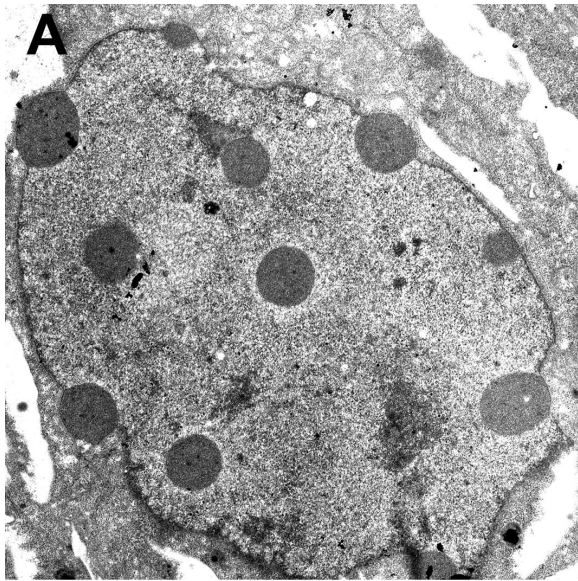
In Abbildung 13 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mutanten- (A-D) und Wildtyp- (E und F) Zellkernen abgebildet. Die Aufnahmen bestätigen die beiden ersten oben aufgeführten Punkte: Die runden Aggregate lagern sich im Zellkern und/oder fast ausschließlich (Abbildung 13C) in der Zellkernperipherie unmittelbar unter der inneren Kernmembran an. In Abbildung 13D ist ein Zellkern abgebildet, in dem das Flag-Lamin A nicht ausschließlich in den Aggregaten vorliegt, sondern auch die innere Kernmembran unterschichtet.

Darüber hinaus ist festzustellen, dass es so scheint, als stülpten sie die Kernmembran in unterschiedlich starkem Ausmaß (vergleiche Abbildung 13A und 13C) nach außen, beziehungsweise die Aggregate werden von der Kernmembran teilweise umschlossen. Es wurden Aufnahmen von Zellkernen gemacht, von denen Flag-Lamin A-Aggregate fast

abgeschnürt waren. In anderen Aufnahmen kamen Aggregate membranumschlossen im Zytoplasma in unmittelbarer Nachbarschaft zum Zellkern vor (ohne Abbildungen).

In einigen Aufnahmen waren Membraneinschlüsse direkt mit einem internen (Abbildung 13C1 und D2) oder membranassoziierten Aggregat (Abbildung 13D1) verbunden. Derartige Membraneinschlüsse wurden beim Wildtyp nur für eine einzelne atypische Zelle gefunden (ohne Abbildung).

Für das Flag-Wildtyp-Konstrukt, und nur für dieses, konnten zusätzlich Aufnahmen von Zellen gemacht werden, die Aggregate nicht in runder, sondern in länglicher, spitz zulaufender Form zeigten und in denen ein Teil des Flag-Lamin A unter der inneren Kernmembran vorlag (Abbildung 13E). Von 18 fotografierten Zellkernen besaßen 5 derartige Aggregate, von je 20-24 fotografierten Mutanten-Zellkernen wurden keine aufgenommen, die diese Form der Aggregat-Bildung zeigten.



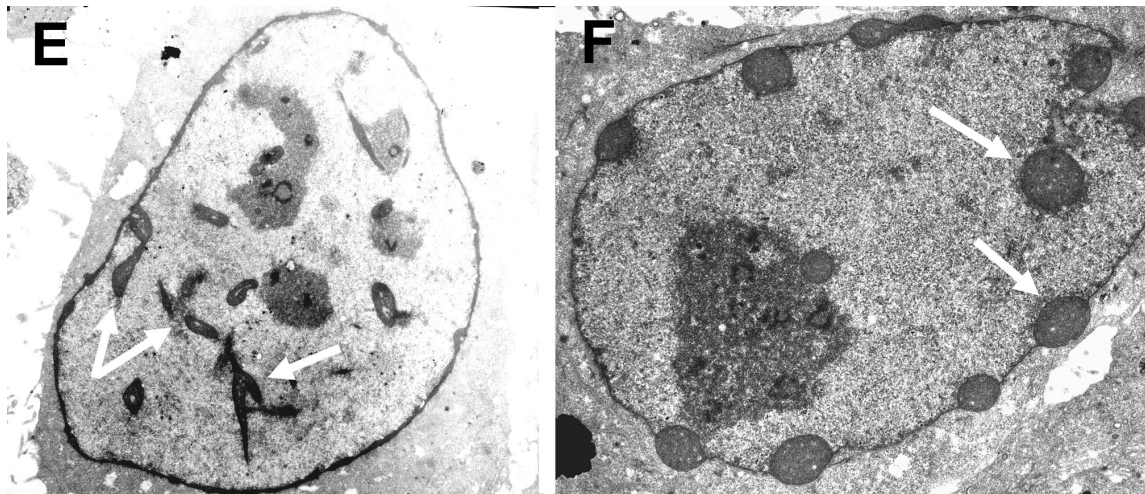


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mutanten- (A-D) und Wildtyp- (E und F) Zellkernen. Die Präparate stammen von Zellen, die 72 Stunden post Transfektion fixiert worden waren. A und D1: Mutante R527P; B, C1 und D2: Mutante R482L; D: Mutante G465D, E und F: Wildtyp. Die Aggregate liegen membranassoziiert oder im Inneren des Nukleus vor. Flag-Lamin A-Aggregate wie in Abbildung 13E konnten nur für Wildtyp-Zellen gefunden werden. Einige Aggregate sind mit einem Stück Kernmembran assoziiert (C1, D1 und D2). Pfeile in E und F weisen auf die unterschiedlich geformten Wildtyp-Lamin A-Aggregate. Vergrößerungen: (A-F) 8800fach, Vergrößerungen C1, D1 und D2 10 000fach

Bereits bei der Betrachtung der Immunfluoreszenzen der Mutanten und Wildtyp-Zellen fiel auf, dass die Mutante R482L deutlich größere Aggregate bildete als die übrigen Mutanten und der Wildtyp. Zur Verifizierung dieser Beobachtung wurde für jedes Konstrukt von zehn willkürlich gewählten Zellen die Durchmesser der Aggregate anhand von Immunfluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen gemessen. Die Ergebnisse aus Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) und Elektronenmikroskopie (EM) stimmen überein und sind nebst Mittelwert und Standardabweichung in Tabelle 5 aufgelistet. Es wird bestätigt, dass die Aggregat-Durchmesser (Angaben in  $\mu\text{m}$ ) der R482L-Zellkerne mit  $1,54 \pm 0,54$  (IF) und  $1,34 \pm 0,54$  (EM) die Größten waren, gefolgt von denen der anderen Mutanten G465D mit  $1,02 \pm 0,31$  (IF) und  $1,09 \pm 0,44$  (EM) und R527P mit  $1,03 \pm 0,41$  (IF) und  $0,98 \pm 0,33$  (EM), die in etwa die gleiche Größe haben. Die Aggregate der Wildtyp-Zellen sind mit  $0,83 \pm 0,22$  (IF) und  $0,73 \pm 0,22$  (EM) deutlich kleiner als die der Mutanten.



IF	WT	G465D	R482L	R527P
x	0,83	1,02	1,54	1,03
s <sub>x</sub>	0,22	0,31	0,54	0,41
n	141	53	35	89
EM	WT	G465D	R482L	R527P
x	0,73	1,09	1,34	0,89
s <sub>x</sub>	0,22	0,44	0,54	0,33
n	77	83	35	64

Tabelle 5: Vergleiche der Aggregat-Durchmesser (in  $\mu\text{m}$ ) von Wildtyp- und Mutanten-Zellen in der Immunofluoreszenz (IF) und der Elektronenmikroskopie (EM). Es wurde die Aggregate von je zehn willkürlich gewählten Zellen gezählt (n), deren Durchmesser bestimmt und Mittelwert (x) und Standardabweichung (s<sub>x</sub>) berechnet. Die Aggregate der Wildtyp-Zellen sind kleiner als die der Mutanten. Die mit dem R482L-Konstrukt transfizierten Zellen bilden die größten Aggregate, gefolgt von denen der Mutanten-Zellen G465D und R527P.

### 3.2.1.7 Ausmaß der Überexpression von Flag-Lamin A in HeLa-Zellen

Die Ergebnisse aus 3.2.1.4 und 3.2.1.6 warfen die Frage auf, ob die vermehrte Bildung der Flag-Lamin A-Aggregate in HeLa-Zellen, die mit mutierter Lamin A-cDNA transfiziert worden waren, eventuell auf eine stärkere Überexpression im Vergleich zum Wildtyp-Lamin A zurückzuführen war.

Um dies zu überprüfen, wurde das Ausmaß der Überexpression bestimmt. Dazu wurden Zell-Extrakte aus HeLa-Zellen (2.4.3) 72 Stunden nachdem sie mit Wildtyp- und Mutanten-Konstrukten transfiziert worden waren, parallel präpariert. Die Extrakte wurden mit SDS versetzt und einer SDS-Gel-Elektrophorese unterzogen. Die Proteine wurden nach Abschluss der Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran überführt (2.3.3) und einer Immundetektion (2.5.2) mit dem Lamin A und Lamin C erkennenden Antikörper 636 unterzogen. Die Membran wurde mit einem LumiImager gescannt und der zugehörigen Software (siehe dazu 2.5.2) ausgewertet (Abbildung 14A). Anschließend wurde die Membran regeneriert und ein "Reblot" durchgeführt (2.5.2). Als Standard-Antikörper für den "Reblot" wurde der V9-Vimentin-Antikörper verwendet (Abbildung 14 B).

Das Ausmaß der Überexpression, welches aus der Lamin A-Bande in 14A abzulesen ist, ist in Abbildung 14C in Form weißer Balken dargestellt. Der Wert der Lamin A-Expression nicht transfizierter Zellen wurden gleich 1 gesetzt. Das Ausmaß der Überexpression pro transfizierte Zelle wurde anhand der Transfektionseffizienzen für Wildtyp und Mutanten berechnet. Die Werte sind in Form schwarzer Balken in Abbildung 14C dargestellt. Pro transfizierte Zelle ist der Flag-Lamin A-Wildtyp und die mutierte Form

R527P 20fach überexprimiert worden. G465D-Flag-Lamin A ist 24fach und R482L-Flag-Lamin A 10fach überexprimiert worden.

Die Transfektionseffizienz für die R482L-Mutante ist mit 20% relativ gering (Vergleiche Tabelle in Abb. 14C unten). In einem gleichgearteten Experiment, in dem die Transfektionseffizienzen für Wildtyp mit 35% und für die R482L-Mutante mit 32% fast gleich hoch waren, war die Überexpression pro transfizierte Zelle für den Wildtyp ebenfalls doppelt so hoch wie für die Mutante R482L. Für die Mutante R482L waren die Transfektionseffizienzen im Vergleich zu den übrigen Mutanten und dem Wildtyp trotz Gleichbehandlung häufig deutlich geringer.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die vermehrte Bildung von Aggregaten bei den mit mutierten Lamin A-cDNAs transfizierten Zellen im Vergleich zu denen, die mit dem Wildtyp-Konstrukt transfiziert worden waren nicht auf eine stärkere Überexpression zurückzuführen ist. Die Wildtyp-Zellen exprimieren pro Zelle genauso viel Flag-Lamin A wie die R527P-Zellen und sogar doppelt so viel wie die R482L-Zellen.

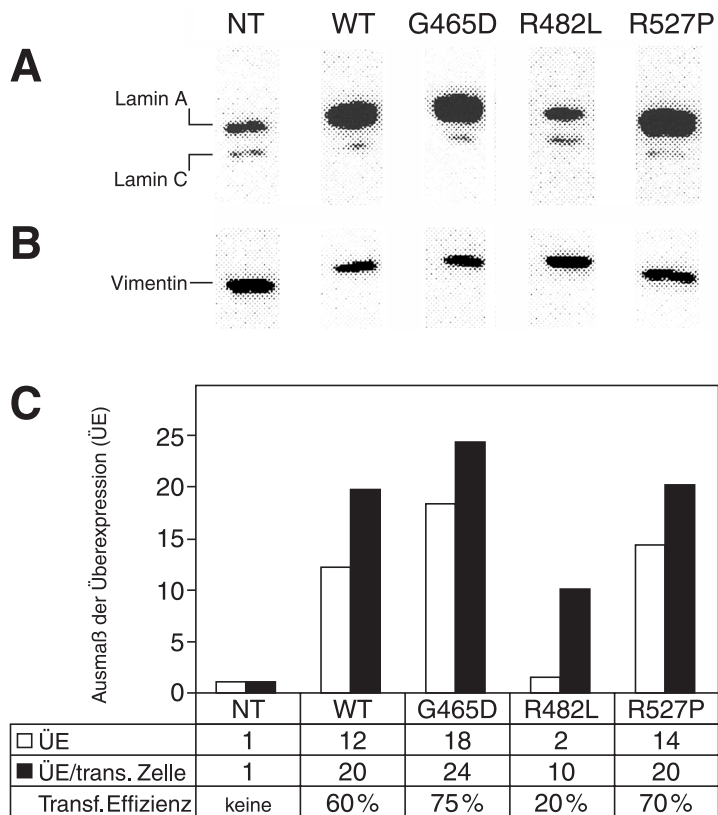


Abbildung 14: A: Immunoblot von nicht transfizierten (NT), Wildtyp- (WT) und Mutanten-HeLa-Zellen, deren Zell-Extrakte mittels SDS-PAGE getrennt und mit dem Anti-Lamin A/C 636-Antikörper gefärbt worden waren. B: "Reblot" des Immunoblots aus A mit dem V9-Vimentin-Antikörper. C: Auftragung des Ausmaßes der Überexpression für Wildtyp und Mutanten. Weiße Säulen = gemessene Überexpression, schwarze Säulen = Überexpression pro transfizierte Zelle (ÜE/trans.Zelle). Der Expressionswert der nicht transfizierten

Zellen wurde zur Normierung gleich 1 gesetzt. Die den Säulen zugehörigen Werte sind darunter zuzüglich der Transfektionseffizienzen (Transf.Effizienz) aufgelistet. Pro transfizierte Zelle sind der Flag-Lamin A-Wildtyp und die mutierte Form R527P 20fach, G465D-Flag-Lamin A 24fach und R482L-Flag-Lamin A 10fach überexprimiert worden. Die R482L-Zellen exprimieren nur halb so viel Flag-Lamin A wie der Wildtyp.

### 3.2.1.8 Überprüfung der Teilungsfähigkeit von Zellen mit Aggregaten

Im Folgenden sollten die Auswirkungen der Lamin A-Mutationen beziehungsweise der Flag-Lamin A-Aggregate auf die Teilungsfähigkeit der HeLa-Zellen untersucht werden. Dazu wurden HeLa-Zellen mit dem R527P-Konstrukt transfiziert, 72 Stunden post Transfektion trypsinisiert und auf Deckgläser mit einem eingelassenen Grid plattiert (siehe dazu 2.4.7). Ausgewählte Gruppen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden mit dem Lichtmikroskop fotografiert, unmittelbar nach der letzten Aufnahme fixiert und mit dem M2 Anti-Flag-Antikörper gefärbt. Eine Gruppe ist in Abbildung 15 exemplarisch abgebildet. 24 Stunden (15A) nach dem Umplattieren wurde hier eine Gruppe von sechs Zellen fotografiert, die nach 72 Stunden zu einer Anzahl von 36 Zellen herangewachsen war (15C), von denen 24 transfiziert waren und wiederum 8 davon deutliche Lamin A-Aggregate in ihren Zellkernen zeigten (siehe Pfeil in 15D).

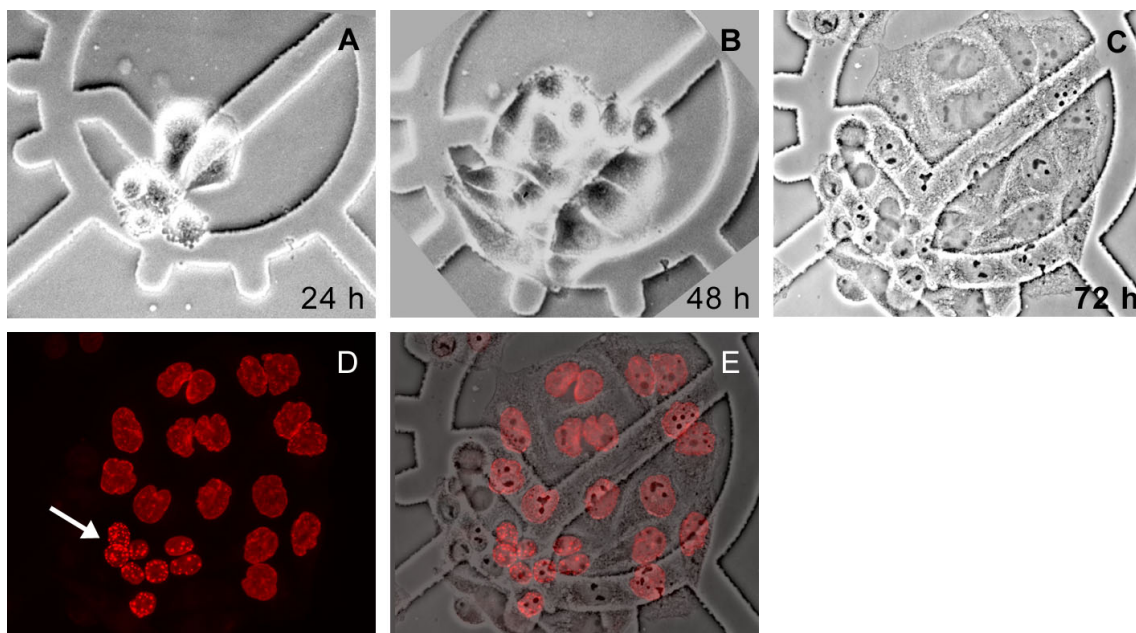


Abbildung 15: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Gruppe von HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 72 Stunden nach der Transfektion mit dem R527P-Konstrukt trypsinisiert und replatiert. Die ausgewählte Gruppe von 6 Zellen wurde nach 24 Stunden (A), 48 Stunden (B) und 72 Stunden (C) mit dem Lichtmikroskop fotografiert und direkt nach der letzten Fotoaufnahme fixiert (Abbildung C zeigt eine Aufnahme der Gruppe nach der Fixierung mit der Digitalkamera) und mit dem M2 Anti-Flag-Antikörper gefärbt (D). Abbildung E: Überlagerung der Bilder C und D. In C ist eine Gruppe (siehe Pfeil) von 8 Zellkernen zusehen, die deutliche Aggregate ausweisen. Vergrößerung: 584fach.

Die Transfektionseffizienzen lagen zum Zeitpunkt der Trypsinisierung bei 77%, zwei Tage nach dem Umplattieren bei 24% und am 3. Tage nur noch bei 17%. Diese Abnahme der Transfektionseffizienz nach einem Tag Wachstum von 24% auf 17% könnte darauf hindeuten, dass die mit dem R527P-Mutanten-Konstrukt transfizierten Zellen langsamer wachsen als nicht transfizierte Zellen. Die große Abnahme der Transfektionseffizienzen nach Trypsinisierung und Ausplattierung legt die Vermutung nahe, dass eventuell ein Teil der transfizierten Zellen durch die Umplattierung verloren gegangen waren.

### **3.2.1.9 Wie reagieren Flag-Lamin A-Aggregate tragende Zellen auf Stress?**

Während der Arbeit an den Mutationen veröffentlichten VIGOUROUX und Mitarbeiter (VIGOUROUX et al. 2001), dass aus FPLD-Patienten stammende Fibroblasten sensitiv auf Hitzeschock-Experimente reagierten. Die Zellkerne der Zellen, die für 30 Minuten einem Hitzeschock bei 45°C ausgesetzt worden waren, wurden als stark deformiert beschrieben. Die Lamin A/C-Verteilung deutete auf Ausstülpungen der Kernhülle hin, in denen Lamin A und C in linearen und verzweigten Strukturen vorlag.

Mit Wildtyp- und Mutanten-cDNAs transfizierte HeLa-Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion einem Hitzeschock wie in VIGOUROUX et al. 2001 und unter 2.4.6 beschrieben ausgesetzt. Genauso wie die nicht transfizierten Zellen reagierten weder Lamin A-Wildtyp noch mutiertes Flag-Lamin A tragende Zellen sensitiv auf den Hitzeschock. Der Nachweis erfolgte sowohl durch den M2 Anti-Flag-Antikörper als auch, zum Vergleich mit den nicht transfizierten Zellen, durch einen Lamin A-Antikörper (ohne Abbildung). Auch der "TUNEL"-Test, mit welchem die Apoptoserate der Zellen festgestellt wurde, zeigte weder Auffälligkeiten noch Unterschiede zu den nicht transfizierten Zellen (siehe 3.2.1.5). Es konnte somit nicht festgestellt werden, das Wildtyp-

und Mutanten-Kulturen sensitiv auf einen, wie hier durchgeführten, Hitzeschock reagierten.

### **3.2.1.10 Doppelfärbungen – Auswirkungen der Delokalisation von Flag-Lamin A auf andere Lamine und Lamina assoziierte Proteine**

Die Auswirkungen der Mutationen in LMNA sind an Patienten in Form der schwerwiegenden Krankheitsbilder (EDMD und FPLD) bekannt. Der Weg von der Mutation zur Krankheit ist noch unklar. Nach Untersuchung der Auswirkungen der Mutationen in LMNA auf das Verhalten und Lokalisation des Lamin A-Proteins selbst, wurde im folgenden der Einfluss der mutierten Lamin A-Varianten auf einige seiner Interaktions- und Assoziationspartner *in vivo* untersucht. Vor diesem Hintergrund wurde die Lokalisation von Proteinen untersucht, von denen bekannt ist, dass sie ein Bestandteil der Lamina oder mit dieser assoziiert sind. Dies sind, neben Lamin A selbst, Lamin B1, Lamin B2, Lamin C, Emerin, LAP2 und das Kernporenprotein Nup153.

HeLa-Zellen wurden mit den Wildtyp- und Mutanten-Lamin A-Konstrukten transfiziert, nach 48 Stunden fixiert und einer Doppel-Immunfluoreszenz unterzogen. Für die Mutante R527P sind die Ergebnisse in Abbildung 16 zu sehen. Fünf der sechs untersuchten Proteine kolokalisieren mit den Aggregaten. Das Flag-Lamin A wurde mit einem polyklonalen Anti-Flag-Antikörper beziehungsweise für die Lamin C/Flag-Lamin A-Doppelfärbung mit dem M2 Anti-Flag-Antikörper detektiert.

Lamin A (endogenes und transfiziertes) wurde mit einem Lamin A spezifischen monoklonalen Antikörper gefärbt (Abbildung 16, 1. Reihe). Es ist sowohl eine Färbung der Lamina als auch der Aggregate zu sehen. Die Färbung der Lamina ist mit der nicht transfizierter Zellen vergleichbar (siehe weiße Pfeile in Abbildung 16 oben links). Endogenes Lamin C wurde mit einem polyklonalen spezifischen Antikörper gefärbt. In den transfizierten Zellen wurde es durch das R527P-Flag-Lamin A in die Aggregate rekrutiert. Ein geringer Teil des Lamin C verblieb in der Lamina, wobei diese Färbung nicht immer zu sehen war. Lamin B1, B2, LAP2, Nup153 und teilweise auch Emerin wurden ebenfalls delokalisiert und lagen analog den Aggregaten vor (Abbildung 16, Reihe 3-6). Bei diesen Proteinen lag ebenfalls eine Färbung der Lamina vor, wobei diese für Lamin B1 schwach und für LAP2 gut zu sehen war (vergleiche Abbildung 16, Reihe

3 und 5). Die Delokalisation des Kernmembranproteins Emerin betraf 63% der transfizierten Zellen, in denen R527P-Flag-Lamin A in Aggregaten vorlag. In den restlichen 27% war die Emerin-Verteilung normal. Lag Emerin kolokalisiert mit den Flag-Lamin A-Aggregaten vor, so war seine Färbung nicht vollständig analog der R527P-Flag-Lamin A-Verteilung. Das Emerin lag eher im äußeren Bereich oder am Rand der Aggregate vor, so dass die Verteilung an den Aggregaten als Ring erscheint (siehe weißer Pfeil in Abbildung 16, Reihe 7). Der Rest des Zellkerns ist deutlich dunkler als der nicht transfizierter Zellen (vergleiche nicht transfizierte Zelle ganz links im Bild). 36% der Zellen, die eine veränderte Emerin-Verteilung aufwiesen (63% der transfizierten Zellen) hatten diese ringähnliche Verteilung. In 2-3% der Zellen mit Flag-Lamin A-Aggregaten war Emerin nicht kolokalisiert mit diesen. Es lag stattdessen in Form kleiner Aggregate im Zytoplasma vor, deren Lage vermutlich dem endoplasmatischen Reticulum entspricht (Abbildung 16, unterste Reihe). Weitere 2-3% der Zellen zeigten überhaupt keine Emerin-Färbung. Emerin-Aggregate, die auf den Nukleus beschränkt waren und nicht mit den Flag-Lamin A-Aggregaten kolokalisierten, hatten 4% der Zellen, die R527P-Flag-Lamin A-Aggregaten besaßen (Abbildung 16, unterste Reihe). Die verbleibenden 18% der Zellen zeigten unterschiedlichste Phänotypen, die teilweise nur geringfügig von der normalen Emerin-Färbung abwichen und auf Grund ihrer Vielfalt nicht in Gruppen eingeordnet werden konnten.

Zusammenfassend führt die Überexpression der R527P-Lamin A-cDNA zu einer Delokalisation der untersuchten Proteine von der Kernhülle zu den R527P-Flag-Lamin A-Aggregaten.

Die Lokalisation der oben untersuchten Lamina-Proteine wurde parallel für die beiden anderen Mutanten-Zellen G465D und R482L, sowie für den Wildtyp durchgeführt.

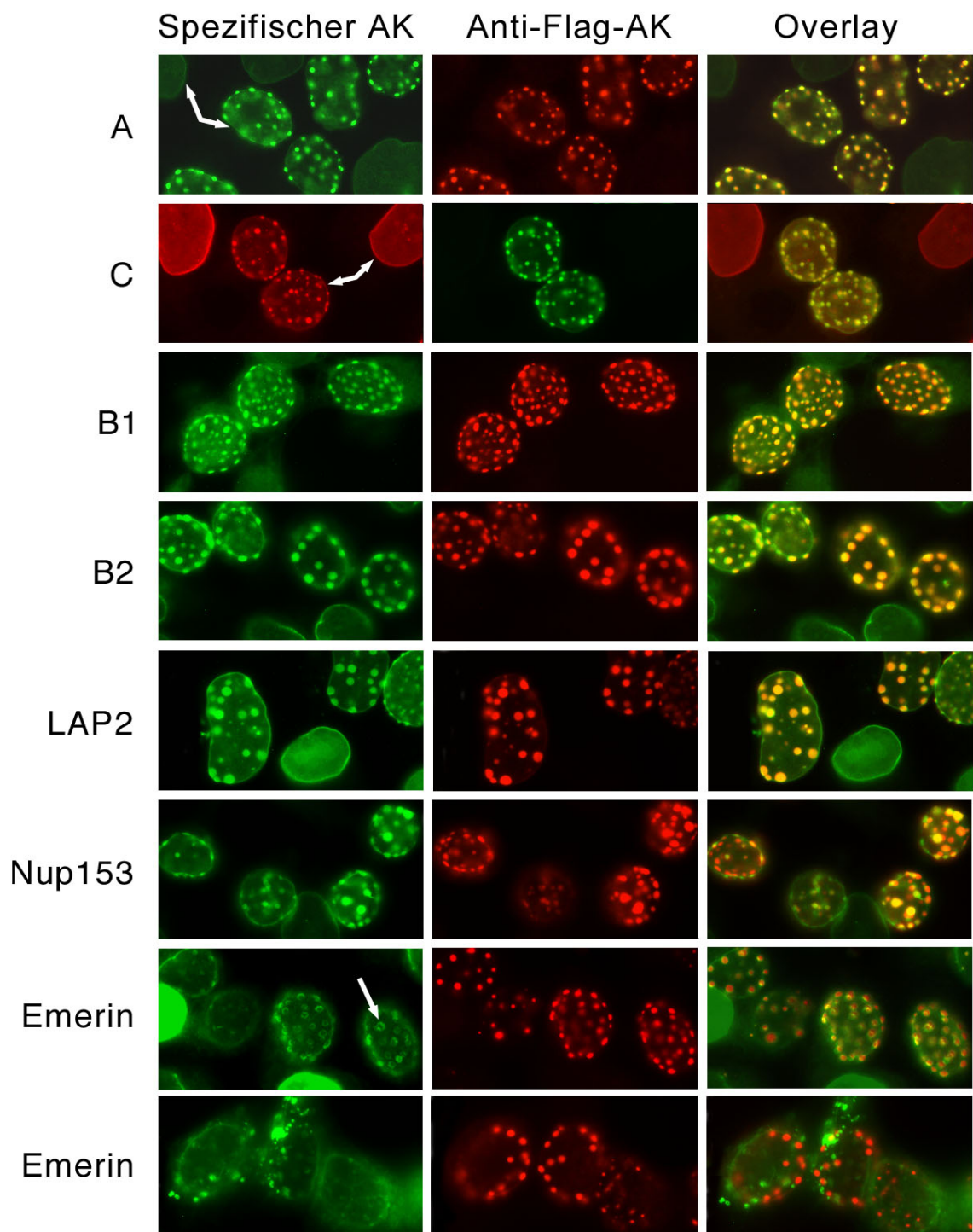


Abbildung 16: Doppel-Immunfluoreszenzen von HeLa-Zellen, welche 48 Stunden nach der Transfektion mit dem R527P-Konstrukt transfiziert worden waren. Primäre Antikörper gegen die endogenen Proteine in der ersten Spalte waren: für Lamin A (Reihe 1) ein monoklonaler Anti-Lamin A-Antikörper aus Maus, für Lamin C (Reihe 2) ein polyklonaler Anti-Lamin C-Antikörper aus Kaninchen, für Lamin B1 (Reihe 3) ein monoklonaler Anti-Lamin B1-Antikörper aus Maus, für Lamin B2 (Reihe 4) ein monoklonaler Anti-Lamin B2-Antikörper aus Maus, für LAP2 (Reihe 5) ein monoklonaler Anti-LAP2-Antikörper aus Maus, für Nup153 (Reihe 6) ein monoklonaler Anti-Nup153-Antikörper aus Maus und für Emerin (Reihe 7 und 8) ein monoklonaler Anti-Emerin-Antikörper aus Maus. Für die Flag-Färbung (Spalte 2) wurde, bis auf die Doppel-Färbung mit Lamin C, ein polyklonaler Anti-Flag-Antikörper eingesetzt. Das Flag-Epitop wurde in der Lamin C-Doppelfärbung mit dem monoklonalen M2 Anti-Flag-Antikörper aus Maus detektiert. Sekundäre Antikörper waren: für die Lamin C/Flag-Doppelfärbung ein Rhodamin-gekoppelter Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper und ein FITC-gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper, für die übrigen Doppel-Färbungen ein FITC-gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper und ein Rhodamin-gekoppelter Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper. Antikörper-Konzentrationen siehe 2.1.8)

### 3.2.1.11 Expression der Lamin A-Schwanz-Domäne in HeLa-Zellen

Die humane Lamin A-Schwanz-Domäne, in der sich die Mutationen G465D, R482L und R527P befinden (Vergleiche Skizze 5, Abschnitt 3.2.1), sollte zur Untersuchung der Mutationen solitär in HeLa-Zellen exprimiert werden. Dazu wurden die Nukleotide 1230 bis 1650 (entspricht Aminosäure 411-551) der Schwanz-Domäne inklusive Kernlokalisierungssignal (Position entspricht Aminosäure 417-422) von Plasmid ständigem LMNA amplifiziert. Die verwendeten Primer waren LMNA 105 S und LMNA 105 AS (Sequenzen siehe 2.6). Das PCR-Produkt wurde zwischen die *EcoR* I und die *Xho* I-Schnittstellen des pCS2+(Flag)-Vektors (siehe 2.1.6 und vergleiche Skizze 6) kloniert. Das Konstrukt wurde in HeLa-Zellen transfiziert, die ein und zwei Tage nach der Transfektion mit Methanol - und in weiteren Versuchen auch mit Formaldehyd - fixiert wurden. Zur Detektion der Flag-Domäne in der Immunfluoreszenz wurde der M2 Anti-Flag-Antikörper eingesetzt. Zur Lokalisation der Nuklei beziehungsweise des Chromatins wurden die Präparate mit Hoechst-Farbstoff gefärbt (2.5.1 Hoechst-Färbung). Trotz vorhandenem Kernlokalisierungssignal lag die Flag-Lamin A-Schwanz-Domäne im Zytoplasma und um den Nukleus herum angeordnet vor (Abbildung 17). Sie konnte die Kernmembran vermutlich nicht passieren.



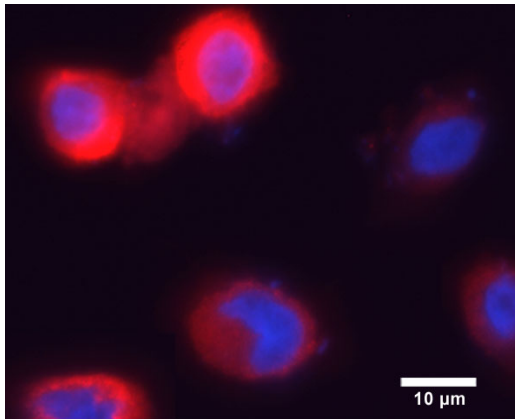


Abbildung 17. Anordnung der Flag-Lamin A-Schwanz-Domäne in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion fixiert und mit M2 Anti-Flag-Antikörper, als primären Antikörper, und Hoechst-Farbstoff (blau) gefärbt. Sekundärer Antikörper war ein Rhodamin-gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper (rot). Die Flag-Lamin A-Schwanz-Domäne liegt im Zytoplasma und um die Nuklei herum angeordnet vor.

### 3.2.2 Das HUTCHINSON-GILFORD-Progeria-Syndrom – Die Mutation G608G (GGC→GGT) in LMNA

Das HUTCHINSON-GILFORD-Progeria-Syndrom (HGPS) ist eine hochgradige Vergreisung mit Minderwuchs und multiplen Fehlbildungen (z.B. ergrauendes Kopfhaar mit Glatzenbildung) ab dem 2.-3. Lebensjahr.

ERIKSSON und Mitarbeiter (ERIKSSON et al. 2003) fanden, dass 18 von 20 HGPS-Patienten eine *de novo* Punktmutation G608G (GGC→GGT, nt1824C>T) in Exon 11 des Lamin A/C-Gens aufwiesen. Die G608G-Mutation ist eine “stille” Mutation, dass heisst die Nukleotidsubstitution auf DNA-Ebene führt zu keiner Aminosäuresubstitution auf Proteinebene. Jedoch entsteht durch den Nukleotidaustausch eine abnormale Spleißstelle, die dazu führt, dass 150 Nukleotide aus der Präkursor-RNA herausgeschnitten werden. Das Translations-Produkt ist somit 50 Aminosäuren kürzer als das ursprüngliche Lamin A-Protein.

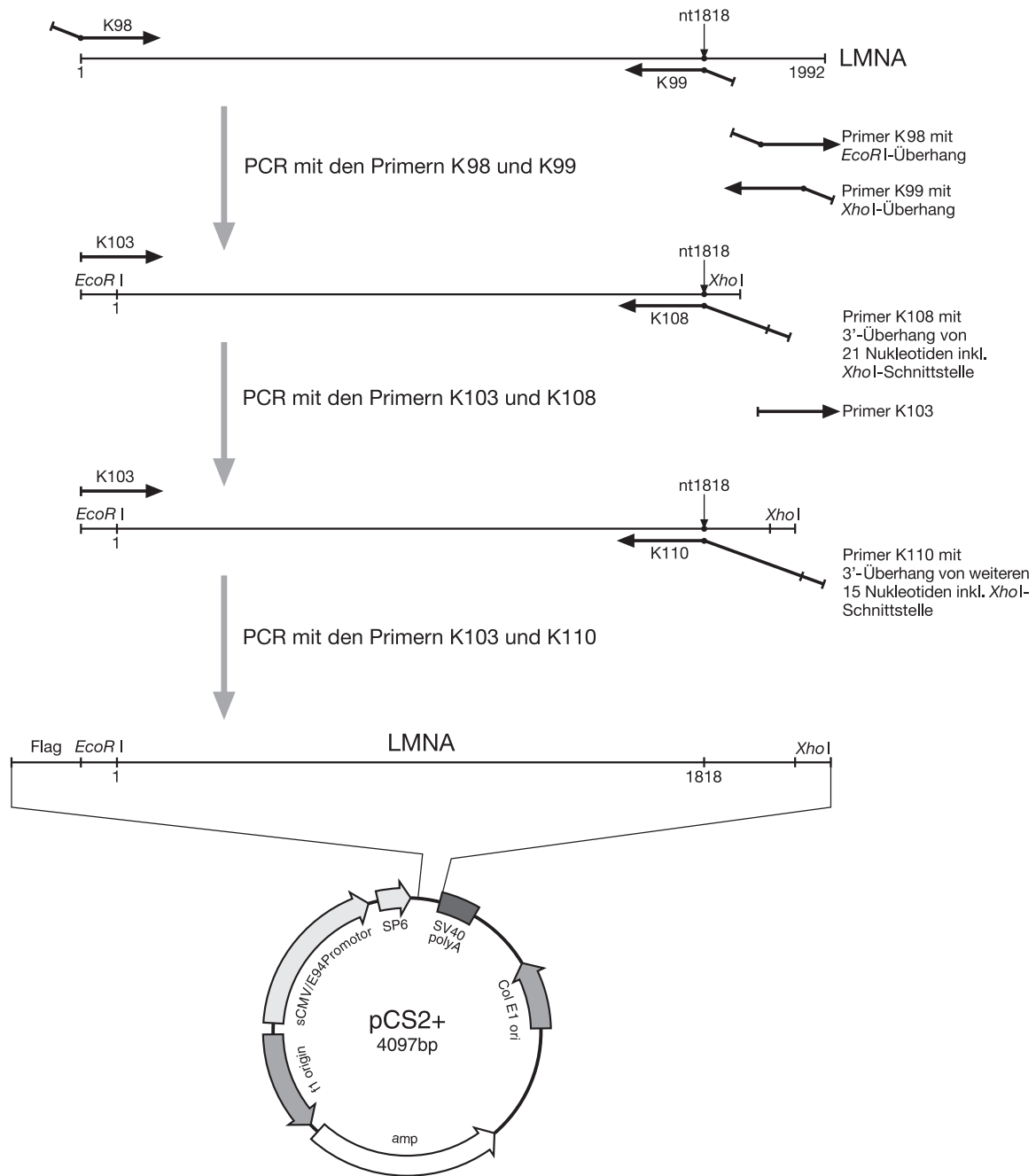
#### 3.2.2.1 Konstrukt-Erstellung für die Untersuchung der HGPS-Mutation

Zur Untersuchung der G608G-Mutation wurde erstens die Nukleotid-Substitution in LMNA durch *in vitro*-Mutagenese (2.2.1.11) eingeführt. Zweitens wurde ein Lamin A-Konstrukt erstellt, das dem 50 Aminosäuren kürzeren Lamin A-Protein aus HGPS-Patienten entspricht. Die Deletion von 150 Nukleotiden (r.G1819\_1968del) war für eine *in vitro*-Mutagenese (nach 2.2.1.11) zu groß. Das Lamin A-Protein hat eine Länge von 1992 Nukleotiden. So wurde zunächst ein PCR-Produkt von Nukleotid 1–1818 erstellt

und die restlichen 24 Nukleotide, die sich dem Ende des Deletionsbereiches (nt.1968) anschließen, Stück für Stück durch PCR mit verlängernden Primern an das jeweilig entstehende Produkt angefügt.

Die G608G-Mutation wurde analog den unter 3.2.1.2 beschriebenen Methode in das pCS2+(FLAG)-Vektor ständige LMNA eingeführt. Die eingesetzten Primer K100 und K101 sind gemäß Herstellerangaben entworfen worden. Nach erfolgter Mutagenese wurde die Mutation in der Sequenz durch die Sequenzierung des Konstruktes bestätigt.

Für das Deletionskonstrukt wurde mit den Primern K98 und K99 zunächst das 1818 Basenpaare lange PCR-Produkt erstellt, das dem Bereich vor der Deletion im Lamin A/C-Gen entspricht. Dazu wurden 50 ng eines Plasmid ständigen LMNA mit einer "Annealing"-Temperatur von 60°C und einer Elongationszeit von 4 Minuten in eine PCR (2.2.1.10) eingesetzt. Auf etwa 40 ng des resultierenden Produktes wurde, nach dessen Gelelution (2.2.1.4) wiederum mit den Primern K103 und K105 eine gleichgeartete PCR durchgeführt, die das ursprüngliche Produkt um 21 Nukleotide verlängerte. In einer dritten PCR wurde mit den Primern K103 und K110 das endgültige PCR-Produkt erstellt. Der Gegenstrang-Primer K110 lagerte sich an 15 der, aus der vorangegangenen PCR und Verlängerung stammende Nukleotide an. Er verlängerte das zu amplifizierende Fragment selbst nochmals um weitere 15 Nukleotide inklusive Stop-Codon und *Xho* I-Schnittstelle. Das so erstellte PCR-Produkt wurde zwischen die *EcoR* I- und *Xho* I-Schnittstelle des pCS2+(Flag)-Vektors eingefügt (siehe Skizze 9).



Skizze 9: Schematische Darstellung der Erstellung der verkürzten Lamin A/C-cDNA (c.1819\_1968del). Der Bereich vor der Deletion (Nukleotid 1-1818) des Lamin A/C-Gens wurde zunächst mit den Primern K98 und K99 amplifiziert, um dann in zwei weiteren PCR mit den jeweiligen Primerpaaren K103/K108 und K103/K110 um den Bereich nach der Deletion (Nukleotid 1968-1992) verlängert zu werden. nt = Nukleotid

### 3.2.2.2 Auswirkung der HGPS-Mutation auf HeLa-Zellen

Die beiden Konstrukte G608G-Flag-Lamin A und c.1819\_1969del-Flag-Lamin A wurden parallel zum Wildtyp-Konstrukt (3.2.1.1) in HeLa-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach ein, zwei und drei Tagen mit Methanol fixiert und mit M2 Anti-Flag-Antikörper einer Immunfluoreszenz (2.5.1) unterzogen.

Für die G608G-Mutation ließ sich kein Unterschied zum Wildtyp-Konstrukt feststellen (ohne Abbildung).

Für die c.1819\_1969del-Mutation war ein deutlicher Phänotyp zu sehen (Abbildung 18). Das verkürzte Lamin A-Protein war in Form von feinen Pünktchen im Kern zu sehen, wie es aus Lamin A-Färbung nicht transfizierter Zellen bekannt ist (vergleiche Abbildung 8a, Abschnitt 3.2.1.1). Neben der Pünktchen-Verteilung liegt das verkürzte Lamin A jedoch in großen Aggregaten und Strängen im Kern vor (Abbildung 18).

Die Transfektionseffizienzen lagen mit < als 5% weit unter einem für eine Auswertung benötigten Wert. Daraufhin wurden die DNA des c.1819\_1969del-Konstruktes auf unterschiedliche Weise aufgereinigt (1. Qiafilter Plasmid Midi Kit, 2. Endofree Plasmid Midi Kit, beides von Qiagen), die Konstrukte wurden mit unterschiedlichen Transfektionsagenzien (2.4.4) in aufsteigenden Reihen von DNA- und Transfektionsagenz-Konzentration transfiziert. Mit dem Polyfekt-Transfektionsagenz konnte bei doppelter Agenz- und DNA-Konzentration die Transfektionseffizienz auf knapp 10% erhöht werden, was für eine Auswertung noch nicht ausreichend ist. Die Konstrukte wurden daraufhin mittels Elektroporation in HeLa-Zellen gebracht. Die Transfektionseffizienz lag auch bei dieser Art der Transfektion bei knapp 10%.

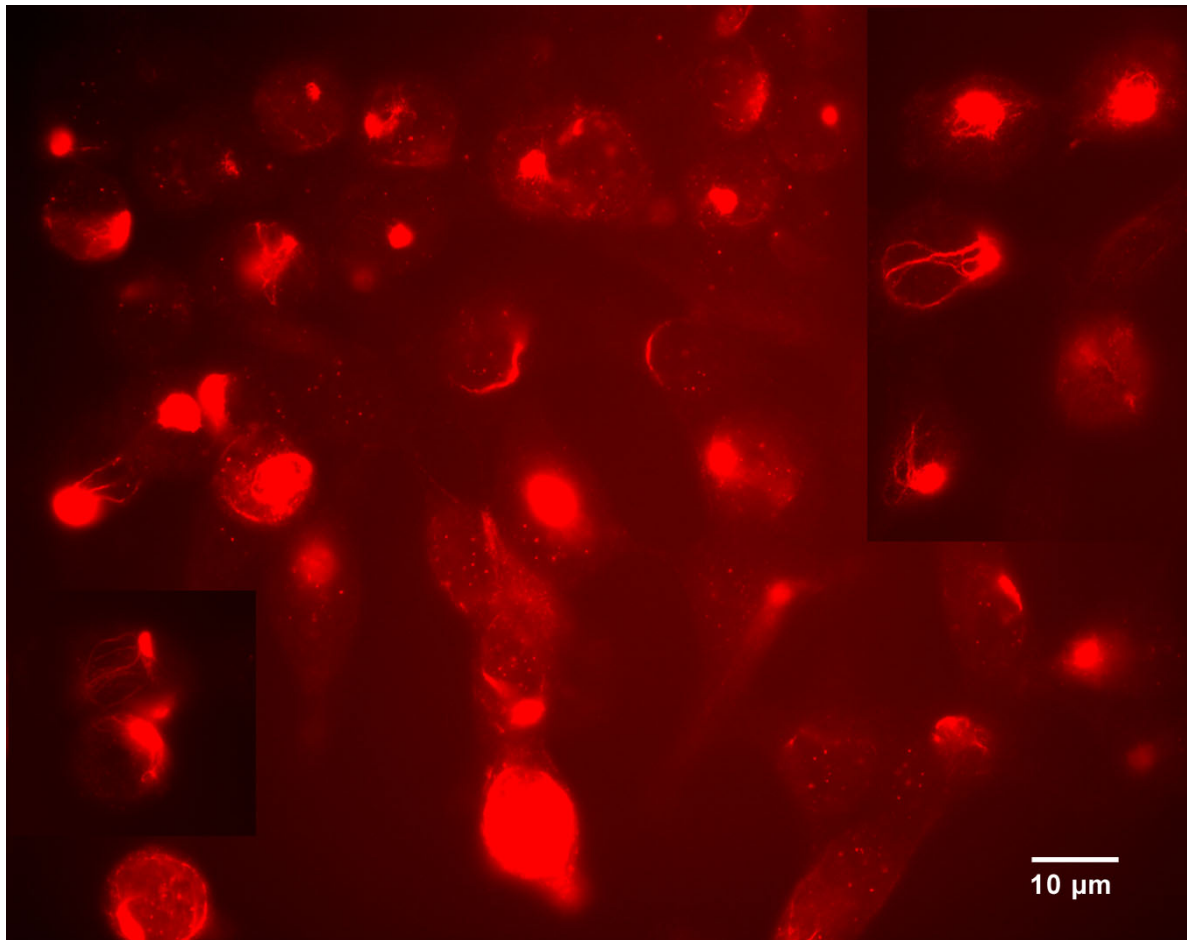


Abbildung 18: Expression des c.1819\_1969del-Flag-Lamin A-Konstruktes in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden drei Tage nach Transfektion mit Methanol fixiert und mit M2 Anti-Flag-Antikörper gefärbt. Zweiter Antikörper war ein Rhodamin-gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper. Das verkürzte Protein liegt in Form von Pünktchen, großen Aggregaten und Strängen im Nukleus vor.

Da die Transfektionseffizienz trotz verschiedener Verbesserungsversuche nicht erhöht werden konnte, wurde die Arbeit an der HUTCHINSON-GILFORD-Mutation G608G zunächst eingestellt.

### 3.3 Silencing von LMNA und STA (Emerin)

In LMNA-Null-Mäusen wurde eine Delokalisation des Kernmembranproteins Emerin ins Zytoplasma beobachtet. Emerin war in den Zellen, die kein Lamin A/C auswiesen, weitgehend zytoplasmatisch. Es kolokalisierte dort vermutlich mit dem endoplasmatischen Reticulum (SULLIVAN et al. 1999).

Im folgenden sollte die gegenseitige Abhängigkeit von Lamin A/C- und Emerin mittels RNA-Interferenz untersucht werden. Dazu wurde die Expression der jeweiligen Gene durch siRNAs (*small interfering RNAs*) in HeLa-Zellen herunterreguliert und die Auswirkungen auf Proteinebene betrachtet. Dabei galt es herauszufinden, ob die Methode der RNA-Interferenz vermittelt durch siRNAs am LaminA/C-Gen das gleiche Ergebnis für die Emerin-Delokalisation liefert, wie in LMNA-Null-Mäusen beobachtet. Weiterhin sollte mit dieser Methode untersucht werden, ob umgekehrt die Abwesenheit von Emerin in HeLa-Zellen einen Einfluss auf das LaminA/C-Expressionsmuster hat.

HeLa-Zellen wurden, wie unter 2.4.4 beschrieben, mit LaminA/C- und Emerin-siRNAs (Erstellung: 2.2.2.1.1) transfiziert und nach 42 Stunden mit Methanol fixiert. Die siRNA-Sequenzen und Positionen im Gen sind unter Abschnitt 2.2.2.1.2 aufgeführt.

Zum Nachweis des *silencing* wurden die mit siRNA transfizierten Zellen mit einem Antikörper gegen das Zielprotein gefärbt. Als Kontrolle wurden parallel dazu Zellen mit einer unspezifischen siRNA gegen das Luciferase-Gen aus der Feuerfliege, *Photinus pyralis* (GL2), transfiziert und mit demselben Antikörper gefärbt. In Abbildung 19 sind die Immunfluoreszenzen des Lamin A/C-*silencing* und in Abbildung 20 die des Emerin-*silencing* mit den jeweiligen Kontrollen (GL2 *Pp luc*) abgebildet.

Beim LMNA-*silencing* (Abbildung 19) sieht man die deutliche Reduktion der Proteinexpression in Abbildung 19a. Der Großteil der Zellen zeigt eine schwache LaminA/C-Färbung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19c). In der Mitte des Bildes 19a sind zwei wahrscheinlich nicht transfizierte Zellen, beziehungsweise solche mit einer normalen LaminA/C-Färbung zu sehen. Die Emerin-Färbung der Zellen, die mit LaminA/C-siRNA-Duplices transfiziert worden sind, zeigt, dass der Verlust von Lamin A/C Emerin vom Kern ins Zytoplasma delokalisiert (Abbildung 19b). Neben dem hier zytoplasmatischen Emerin ist ein Teil des Emerins immer noch als ringähnliche Färbung in der Zellkernperipherie zu sehen. Die Zellen der Kontrolle zeigen eine normale

Emerin-Färbung mit vollständiger Lokalisation im Kern. Das Ausmaß der Reduktion von Lamin A/C in Lamin A/C-siRNA transfizierten Zellen wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (2.2.1.10) bestimmt. Dabei kam heraus, dass Lamin A/C in den siRNA transfizierten Zellen auf 1/5 der normalen Expression reduziert worden war (ohne Abbildung, verwendete Primer siehe 2.6).

Die Transfektion von HeLa-Zellen mit Lamin A/C-siRNAs und die damit verbundene Reduktion von Lamin A/C bewirkt somit die gleiche Delokalisation von Emerin, wie sie bereits von Sullivan und Mitarbeitern (SULLIVAN et al. 1999) in LMNA-Null-Mäusen gefunden wurde.

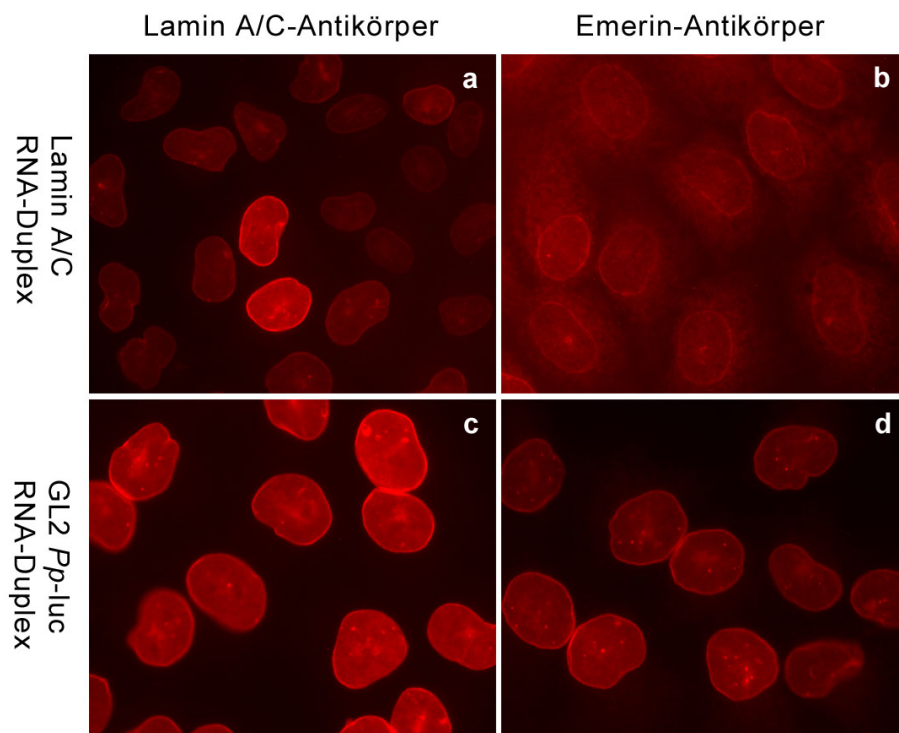


Abbildung 19: *Silencing* von Lamin A/C in HeLa-Zellen (a+b) und Kontroll-Transfektionen mit dem GL2 *Pp-luc* RNA-Duplex (c+d). a) und c): Färbungen mit Anti-Lamin A/C -Antikörper. b) und d): Färbungen mit Anti-Emerin-Antikörper. Sekundärer Antikörper war ein Rhodamin-gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper. In Abbildung b) sieht man, dass der Großteil des Emerins im Zytoplasma vorliegt. Vergrößerung: 425fach

Das Emerin-*silencing* (Abbildung 20) zeigt die Reduktion von Emerin in den mit Emerin-siRNAs transfizierten Zellen (20a). Die Emerin-Färbung erscheint hier, bis auf einige vermutlich nicht transfizierte Zellen, deutlich dunkler als in der Kontrolle (20c). In

Abbildung 20b sieht man, dass die effektive Transfektion mit Emerin-siRNAs keinen Einfluss auf die Expression und Lokalisation von Lamin A/C hat, wie der Vergleich mit den Kontroll-Zellen (Abbildung 20d) zeigt. Das Lamin A/C-Expressionsmuster in Abbildung 20b ist mit dem der Kontroll-Zellen identisch.

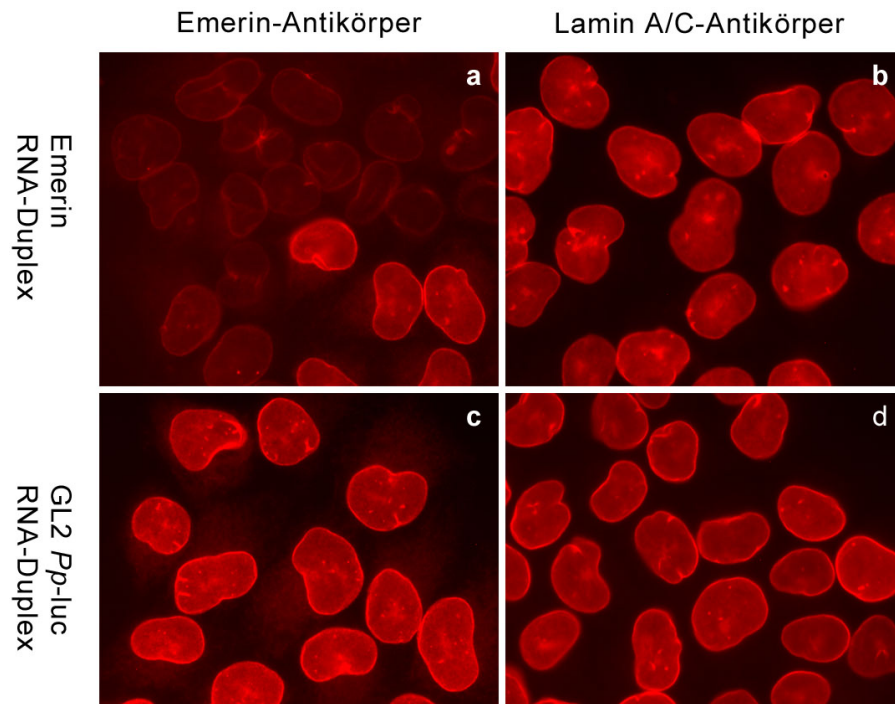


Abbildung 20: *Silencing* von Emerin in HeLa-Zellen (a + b) und HeLa-Zellen aus Kontroll-Transfektionen mit GL2 *Pp-luc* RNA-Du-plex (c + d). a) und c): Färbungen mit Anti-Emerin-Antikörper. b) und d): Färbungen mit Anti-Lamin A/C-Antikörper. Sekundärer Antikörper war ein Rhodamin-gekoppelter Ziege Anti-Maus-Antikörper. Die Lamin A/C-Färbungen in Abbildung b) (Emerin-*silencing*) und d) (Kontrolle) sind identisch. Vergrößerung: 425fach



## 4 Diskussion

### 4.1 Die Strukturaufklärung der globulären Lamin-Schwanz-Domänen

Die globulären Schwanzdomänen von rekombinantem humanen Lamin A und *C. elegans*-Lamin wurden in der vorliegenden Arbeit in ausreichender Menge und Qualität für die geplanten Kristallisationen aufgereinigt und an die Kooperationspartner (Prof. U. Aebi, Biozentrum Basel) zur Strukturaufklärung durch Röntgenkristallographie übersandt. Zusätzlich wurde die globuläre Struktur der humanen Lamin A-Domäne durch die Anfertigung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt.

Die Arbeit an den Kristallisationen beziehungsweise Strukturaufklärungen wurde für beide Proteine vor Abschluss der Projekte aus folgenden Gründen eingestellt:

1. Für *C. elegans*-Lamin ergaben sich keine verwertbaren Kristalle.
2. Die Struktur der humanen Lamin A-Domäne sollte durch eine andere Arbeitsgruppe in Kürze veröffentlicht werden.

DHE-PAGANON und Mitarbeiter kristallisierten den Bereich des Lamin A/C-Proteins von Aminosäure 436 bis 552, während in der vorliegenden Arbeit die Aminosäuren 434 bis 551 des Lamin A-Proteins untersucht wurden (DHE-PAGANON et al. 2002). DHE-PAGANON und Mitarbeiter fanden, dass die Struktur der hLamin A-Domäne neun Ig-ähnliche Faltungen aus  $\beta$ -Strängen aufweist. Außerdem wurde die Lage einiger Aminosäuren, die von Mutationen im Lamin A/C-Gen betroffen sind und in Zusammenhang mit einigen Laminopathien stehen, aufgezeigt. Darin eingeschlossen sind ebenfalls die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen G465D, R482L und R527P. Die Bedeutung der Lage dieser mutierten Aminosäuren wird in Abschnitt 4.7 diskutiert.

### 4.2 Aggregat-Bildung als Mutanten spezifischer Effekt und als Auswirkung der Überexpression

Lamin A-Aggregate zeigten sich sowohl in mit Mutanten-Konstrukten transfizierten Zellen als auch in solchen, die mit dem Wildtyp-Konstrukt transfiziert worden waren. Das heisst, dass die Aggregat-Bildung *per se* höchstwahrscheinlich mit der Überexpression der Konstrukte in Zusammenhang steht. So führten beispielsweise mutierte Lamin B1-Formen, die zwei- bis vierfach überexprimiert worden waren, ebenfalls zur

Bildung von Aggregaten (IZUMI et al. 2000), wohingegen mutierte Lamin B2-Proteine, die in geringerem Maß als das endogene Lamin B2 exprimiert worden waren, keine Aggregate bildeten (NIGG et al. 1992). Zudem hatten Fibroblasten-Zellkerne, die aus Patienten mit der Lamin A/C-Mutation R482W oder R482Q (FPLD) stammten, ebenfalls keine Aggregate.

Eine mögliche Erklärung für das Phänomen der Aggregat-Bildung ergibt sich aus den folgenden Studien: FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) -Analysen zeigten, dass die A-Typ Lamine später zur Lamina rekrutiert und vermutlich auch später als B-Typ-Lamine in diese eingebaut werden (MOIR et al. 2000). Darüber hinaus wurde rekombinantes Lamin A in *Xenopus*-Ei-Extrakten nur in Gegenwart von Lamin B3 in eine Lamina inkorporiert, die folglich auf B-Typ-Laminen basierte. In Abwesenheit von Lamin B3 lag Lamin A in kleinen Aggregaten im Nukleoplasma vor (DYER et al. 1999). Das heisst, die Rekrutierung und Inkorporation von Lamin A ist von Lamin B3 abhängig. Bei einer 10-24fachen Überexpression von Lamin A sind vermutlich die für den Einbau von zusätzlichem Lamin A in die Lamina benötigten endogenen Proteine –wie beispielsweise die B-Typ-Lamine– nicht in ausreichender Menge vorhanden.

Trotz der Tatsache, dass auch Wildtyp-Zellen Aggregate bilden, fallen eine Reihe von Unterschieden auf, die die Wildtyp-Aggregate von denen der Mutanten-Zellen unterscheiden.

1. Die Anzahl der Zellen, die Aggregate bilden, ist bei den Mutanten deutlich höher als beim Wildtyp (vergleiche Skizze 8, Abschnitt 3.2.1.4).
2. Aus elektronenmikroskopischen und Immunfluoreszenz-Aufnahmen konnte ermittelt werden, dass die Aggregate der Mutanten-Zellkerne 1,2-1,8 mal größer als die der Wildtyp-Zellkerne sind.
3. Es wurden nur in Wildtyp-Zellen längliche, spitzzulaufende Aggregate gefunden.

Die Aggregate der Mutanten-Zellen waren dagegen ausnahmslos rund.

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Mutationen die Polymerisation des Lamin A verändern und so zu einer Mutanten spezifischen Aggregat-Bildung führen.

Ein weiterer Unterschied fiel bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung auf. Während eine Reihe von Mutanten-Zellen Membraneinschlüsse (Abbildung 13 C1, D1 und

D2, Abschnitt 3.2.1.6) zeigten, wurde dies für den Wildtyp nur bei einer einzelnen atypischen Zelle beobachtet. FIDZIANSKA und Mitarbeiter berichteten ebenfalls von Membraneinschlüssen. Sie untersuchten Muskelzellkerne aus Patienten mit AD-EDMD, bei denen die Aminosäure 453 des LMNA von einer Mutation betroffen war (FIDZIANSKA et al. 2003). Die Mutation befindet sich ebenfalls, wie die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen, in der globulären Schwanzdomäne.

Diese Unterschiede traten bei gleicher beziehungsweise nur halb so hoher Expressionsrate des Wildtyp-Konstruktes im Vergleich zu den Mutanten-Konstrukten auf (WT und R527P=20fach, R482L=10fach). Das heisst, diese Unterschiede sind nicht in Zusammenhang mit einer stärkeren Überexpression der Mutanten-Konstrukte zu sehen, sondern sind Mutanten beziehungsweise Wildtyp spezifische Effekte.

Sowohl Östlund und Mitarbeiter als auch Raharjo und Mitarbeiter untersuchten insgesamt 14 Mutationen in LMNA, von denen drei (R527P, R482Q und R482W) die gleichen Aminosäuren betreffen wie die hier untersuchten Mutationen (ÖSTLUND et al. 2001, RAHARJO et al. 2001). Sie beschrieben ebenfalls eine Bildung von Aggregaten in mutierten Zellkernen, allerdings nur für vier der untersuchten Mutanten, N195K, E358K, M371K und R386K in 11-32% der transfizierten Zellen. Die übrigen Mutanten wurden als nicht Aggregat-bildend bezeichnet. Hier besaßen nur 0,3-2,3% der transfizierten Mutanten-Zellen und 0,3% der Wildtyp-Zellen Aggregate (ÖSTLUND et al. 2001). Die transfizierten Zellen wurden in beiden Arbeiten nach 24 beziehungsweise 20-24 Stunden fixiert. In der vorliegenden Arbeit hatte die Mutante G465D 24 Stunden *post* Transfektion etwa die gleiche Anzahl von Aggregat tragenden Zellen wie die Wildtyp-Zellen (WT=1,4%, G465D=1,2%). Eine größere Anzahl von Mutanten-Zellkernen, die Aggregate aufwiesen, stellte sich erst mit zunehmender Zeit *post* Transfektion ein (z.B. G465D=83,8%). Unterschiede zwischen der vorliegenden Arbeit und der anderer Arbeitsgruppen könnten an unterschiedlichen Fixierungszeitpunkten der transfizierten Zellen oder an Unterschieden in den Konstrukten liegen. Aussagen zum Ausmaß der Überexpression wurden in den Arbeiten von ÖSTLUND und RAHARJO und Mitarbeitern nicht gemacht.

### 4.3 Zusammenhang zwischen Phänotypen und Krankheiten

Vergleicht man die Aggregat tragenden Zellen der verschiedenen Mutanten-Kulturen miteinander, so fällt nur ein Unterschied auf: Die Aggregate der Mutante R482L sind mit einem Durchmesser von 1,34 beziehungsweise 1,54  $\mu\text{m}$  deutlich größer als die der übrigen Mutanten (z.B. G465D: 1,02 bzw. 1,09  $\mu\text{m}$ ). Außerdem haben Zellkerne, die R482L mutiertes Lamin A exprimieren, weniger Aggregate pro Zelle als die anderen beiden Mutanten. Manchmal waren sogar nur ein oder zwei sehr große Aggregate pro Zellkern vorhanden. Die Aggregate der Zellkerne der G465D- und R527P-Mutanten waren weitgehend identisch. Diese Beobachtungen können jedoch nicht als krankheitsspezifisch betrachtet werden, da die beiden Mutationen G465D und R482L die Partielle Familiäre Lipodystrophie, Dunnigan-Typ verursachen und R527P die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie.

### 4.4 Einfluss der Aggregat-Bildung auf andere Lamine und Lamina assoziierte Proteine

Die Einführung der Mutationen in das Lamin A/C-Gen führt zur Bildung von Aggregaten in den Zellkernen transfizierter HeLa-Zellen. Sie hatte auf die Lokalisation aller untersuchten endogenen Lamine (C, B1 und B2) bis auf Lamin A selbst und der Lamina assoziierten Proteine (Emerin, LAP2 und Nup153) einen Einfluss. Endogenes Lamin C, B1 und B2 kolokalisierten teilweise mit den Lamin A-Aggregaten. Der restliche Teil der endogenen Lamine verblieb in der Lamina. Das Kernporenprotein Nup153 wurde ebenfalls teilweise in die Aggregate rekrutiert. Gleiches gilt für LAP2 und Emerin. Im Fall von Emerin wurde nur bei 63% der Aggregat tragenden Zellen eine Delokalisation von Emerin beobachtet, wobei Emerin in einem Teil der Zellkerne mit den Aggregaten kolokalisierte und in einem anderen Teil im Zytoplasma beziehungsweise im endoplasmatischen Reticulum vorlag. ÖSTLUND et al. stellten bei der Untersuchung einiger Lamin A-Mutationen ebenfalls fest, dass nur ein Teil der Aggregat tragenden Zellen eine Delokalisation von Emerin zeigten. Sie lag bei ihnen zwischen 28 und 53% der Zellen (ÖSTLUND et al. 2001).

B-Typ-Lamine haben eine wichtige Funktion bei der Bildung der Lamina, insofern sie als Grundlage für den Einbau der A-Typ-Lamine in die Lamina notwendig zu sein scheinen

(s.o.). Hinzu kommt, dass B-Typ-Lamine essentiell sind. Die Eliminierungen von LMNB1 und LMNB2 in HeLa-Zellen durch siRNA-Duplices führten zu apoptotischem Zelltod (HARBORTH et al. 2002). FPLD-Patienten-Fibroblasten und Zellen aus LMNA-Null-Mäusen wiesen ebenfalls ein verändertes Expressionsmuster der B-Typ-Lamine auf. Lamin B fehlte an anormalen Ausstülpungen der Fibroblasten und an einem Pol der Null-Maus-Zellen (VIGOUROUX et al. 2001, SULLIVAN et al. 1999).

Die korrekte Position von B-Typ-Laminen ist für die Bildung einer intakten Lamina wichtig. Dieser Prozess könnte durch die Rekrutierung der B-Typ-Lamine in die Lamin A-Aggregate gestört werden.

Endogenes Lamin C wird ebenfalls in die Aggregate rekrutiert. Es ist nicht essentiell (HARBORTH et al. 2002), aber als ein Hauptbestandteil der Lamina ebenfalls für dessen Funktion von Bedeutung.

LAP2 ist an der Anheftung von Chromatin an die Kernmembran und der Regulation des Kernhüllen- und Laminawachstums beteiligt (GANT et al. 1999, YANG et al. 1997). FPLD-Patienten-Zellen zeigten ebenfalls Veränderungen im LAP2-Expressionsmuster. Die Delokalisation von LAP2-Proteinen durch mutiertes Lamin A könnte sowohl seine Funktion selbst als auch die Interaktion mit Assoziationspartnern nachhaltig beeinflussen. Es wurde hier jedoch für die untersuchten Mutanten keine veränderte Chromatin Organisation und auch kein Einfluss auf das Kernwachstum gefunden.

Nup153 ist ein Bestandteil des Kernporenkomplexes und für dessen Ausbildung und Verankerung in der Kernmembran wichtig (WALTHER et al. 2001). Die Position von Nup153 in der Kernpore (nukleoplasmatischer Ring) erlaubt eine direkte Interaktion mit Lamin-Filamenten. In MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*) aus LMNA-Null-Mäusen wurde gleichfalls eine anormale Nup153-Verteilung festgestellt. Nup153 konnte hier an einem Pol des Kerns nicht detektiert werden, was auf ein Fehlen von Kernporen in dieser Region hindeutet (SULLIVAN et al. 1999). Die hier untersuchten Lamin A-Mutanten rekrutieren Nup153 von der Kernhülle in die Aggregate und bewirken vermutlich eine Veränderung der Kernporenstruktur und der Position der Kernpore.

Der Delokalisation von Emerin durch mutiertes Lamin A kommt eine besondere Bedeutung zu, da Emerin zum einen mit der X-gebundenen Form der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie in Verbindung steht (BIONE et al. 1994), und zum anderen seine Lokalisation

an bzw. in der inneren Kernmembran in Säugetierzellen von Lamin A/C abhängig ist. So wird Emerin in LMNA-Null-MEF und in HeLa-Zellen, in denen Lamin A/C durch siRNAs eliminiert worden ist, zu einem Großteil zum endoplasmatischen Reticulum delokalisiert (SULLIVAN et al. 1999 und Kap. 3.3 dieser Arbeit). In HeLa-Zellen ist Emerin nicht essentiell, da dort seine Eliminierung durch siRNAs keine Auswirkungen hat (vgl. Kap. 3.3 der vorliegenden Arbeit). Mutationen im Emerin-Gen, die meist 'Null'-Mutationen sind und die Synthese von einem vollständigen Emerin verhindern, führen im Menschen allerdings zu schweren klinischen Symptomen.

#### **4.5 Einfluss der Mutationen auf Teilungsfähigkeit und Kernstabilität**

Zellen von FPLD-Patienten hatten eine anormale Kernmorphologie mit knospenartigen Ausstülpungen. Die Zellkerne zeigten außerdem eine geringere Resistenz gegenüber Hitzeschock als die Zellkerne der Kontroll-Personen. Dies äußerte sich nach Hitzeschock-Behandlung in morphologischen Veränderungen der Zellkerne wie Aus- und Einstülpungen der Kernmembran, Löchern, Kanälen und Falten (VIGOUROUX et al. 2001). In Muskelzellkernen von AD-EDMD-Patienten wurden ebenfalls Veränderungen festgestellt. Es wurde ein Verlust und eine veränderte Organisation von Chromatin sowie tiefe Membraneinstülpungen und -einschlüsse gefunden (FIDZIANSKA et al. 2003). Die Membraneinschlüsse wurden in Abschnitt 4.2 bereits diskutiert. Selbst nach einem 30 Minuten langen Hitzeschock konnten keine morphologischen Veränderungen in HeLa-Zellen beobachtet werden, die mit Wildtyp- oder mutierter Lamin A-cDNA transfiziert worden waren. Darüber hinaus konnte kein Einfluss auf die Teilungsfähigkeit transfizierter beziehungsweise Aggregat tragender Zellen festgestellt werden, wenngleich die Anzahl der Aggregat tragenden Zellen mit dem Umplattieren abnahm (siehe dazu 3.2.1.8). Außerdem konnte weder ein Einfluss der Mutationen auf die Apoptoserate der Zellen, noch eine anormale Chromatin-Anordnung festgestellt werden.

Vermutlich spielen weitere Faktoren eine Rolle, die durch die Expression der erstellten Konstrukte nicht zum Tragen kamen oder nicht vorhanden waren.

#### 4.6 Laminopathie-Modelle

Mutationen im Lamin A/C-Gen sind die Ursache für Krankheiten wie Muskeldystrophien, Lipodystrophien und Neuropathien. Es haben sich zwei Modelle herauskristallisiert, durch die versucht wird zu erklären, wie Mutationen in einem Gen zu verschiedenen Krankheiten und Gewebe spezifischen Effekten führen können.

##### Mechanische Stress-/Struktur-Hypothese:

Dieses Modell schlägt vor, dass Mutationen im Lamin A/C-Gen zur strukturellen Schwächung der Lamina führen und deren mechanischen Eigenschaften inklusive deren Widerstandskraft gegenüber mechanischem Stress schwächen. Diese generelle Fragilität könnte physikalische Schäden verursachen, die zum Zelltod und zu Gewebeschäden führen (FAIRLEY et al. 1999, GOLDMAN et al. 2002, GRUENBAUM et al. 2000, HUTCHISON et al. 2000, MORRIS und MANILAL et al. 1999, ÖSTLUND et al. 1999, WILSON et al. 2001).

In der Tat wurde eine Kern-Fragilität von Muskelzellen bei AD-EDMD-Patienten beobachtet (FIDZIANSKA et al. 1998). Ebenso waren Fibroblasten-Zellkerne aus Patienten-Zellen, die eine Mutation an der Aminosäureposition 482 aufwiesen, gegenüber Hitzeschock weniger resistent als die Zellkerne der Kontroll-Individuen (VIGOUROUX et al. 2001). Fibroblasten-Zellkerne sind allerdings nicht wie Muskelzellen starkem mechanischem Stress ausgesetzt, da sie genauso wie Fett- oder Nervenzellen nicht kontraktile sind. Mit der mechanischen Stress-/Struktur-Hypothese kann die zelluläre Pathologie der Krankheiten EDMD, LGMD1B und CMD, in die Muskelgewebe involviert sind, erklärt werden. Krankheiten wie FPLD und CMT2, bei denen Fett- beziehungsweise Nervenzellen betroffen sind, sind mit dieser Hypothese nicht erklärbar. Außerdem sind beispielsweise Epidermiszellen, die sehr starkem mechanischem Stress ausgesetzt sind, in EDMD-Patienten nicht betroffen. Allerdings ist zu bemerken, dass in Zellen des Herz- und Skelettmuskels nur ein B-Typ-Lamin, nämlich Lamin B2, exprimiert wird (BROERS et al. 1997). Folglich könnte speziell in diesen Geweben durch ein fehlendes B-Typ-Lamin Lamin A/C eine größere Bedeutung zukommen. Dies könnte sich in Zellen, in denen Mutationen im Lamin A/C-Gen stattgefunden haben, stärker auswirken als in Zellen (z.B. Fibroblasten), in denen sämtliche A- und B-Typ-Lamine exprimiert werden.

### Genexpressions-Hypothese:

Diese Hypothese besagt, dass Lamin A/C und eventuell assoziierte Proteine die Expression von spezifischen Genen in spezifischen Zelltypen regulieren. Mutationen im Lamin A/C- und auch Emerin-Gen beeinflussen die Regulation von diesen Genen direkt oder indirekt und führen durch eine veränderte Genexpression zu verschiedenen Krankheiten in verschiedenen Geweben (COHEN et al. 2001, GRUENBAUM et al. 2000, WILSON 2000). Es ist tatsächlich belegt, dass Lamine an eine Reihe von Proteinen binden, die an der Transkription beteiligt sind. Beispielsweise bindet das Retinoblastomprotein, ein Tumorsuppressor, an Lamin A und C (MANCINI et al. 1994). SREBP1, ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der Cholesterol Biosynthese und Adipogenese beteiligt ist, bindet an Lamin A (LLOYD et al. 2002). LLOYD und Mitarbeiter zeigten, dass die Bindungs-Affinitäten einiger FPLD- und EDMD-spezifischer Lamin A-Mutanten an SREBP1 verringert werden, was die Genexpressions-Hypothese unterstützt. Darüber hinaus identifizierten STIERLÉ und Mitarbeiter zwei Peptidregionen im Lamin A/C-Protein, die an der DNA-Bindung beteiligt sind. Die eine Region beinhaltet das Kernlokalisierungssignal und die andere befindet sich im Umfeld der Aminosäure 482. Mutationen in dieser Aminosäure verringern die Affinität des Lamin A- und C-Proteins für DNA (STIERLÉ et al. 2003).

### Welche der beiden Hypothesen unterstützt die vorliegende Arbeit?

Die Doppelfärbungen der Aggregat tragenden Zellen zeigen, dass das mutierte Flag-Lamin A-Protein zur Delokalisation von Proteinen führen kann,

1. die Bestandteil der Lamina sind,
2. die für die Verankerung der Lamina in der inneren Kernmembran wichtig sind

und Nup153, das für die Formation und Platzierung der Kernpore wichtig ist. Besonders die unter 1. und 2. aufgeführten Proteine sind für die Stabilität der Lamina und somit der Kernhülle von großer Bedeutung. Eine instabile Lamina würde die Struktur des Kerns schwächen, was die mechanische Stress-/Struktur-Hypothese unterstützen würde. Auf der anderen Seite konnten bei den Zellen, die mit mutierter Lamin A-cDNA transfiziert worden waren, keine Anzeichen von Instabilität festgestellt werden.



Eine Aussage zur Genexpressions-Hypothese kann in Bezug auf diese Arbeit nur für die Chromatin-Lokalisation gemacht werden, die bei den Mutanten-Zellkernen nicht verändert war und somit diese Hypothese nicht unterstützt. Um weitere Aussagen zu dieser Hypothese zu machen, müsste beispielsweise der Einfluss auf Transkriptionsfaktoren oder die DNA-Bindungsaffinität der mutierten Lamin A-Moleküle genauer untersucht werden.

#### **4.7 Position der Aminosäuren G465, R482 und R527 in der Lamin A-Ig-Domäne**

Die dreidimensionale Struktur der globulären Lamin A-Schwanzdomäne wurde als Ig-ähnlich beschrieben (DHE-PAGANON et al. 2002, KRIMM et al. 2002). Diese Strukturauflösung sagt unterschiedliche Auswirkungen von EDMD-Mutationen (z.B. R527P) und FPLD-Mutationen (z.B. G465D und R482L) auf das Molekül voraus. Es wurde gezeigt, dass die Aminosäurereste, die FPLD betreffen, an einer bestimmten besonders exponierten Stelle des Moleküls liegen, wo sie eine positiv geladene Interaktionsstelle bilden. Hingegen sind die Aminosäurereste, die Muskel spezifische Krankheiten verursachen, eher im Innern des Moleküls lokalisiert. Somit wird bei Mutationen in diesen Resten eher ein Einfluss auf die Struktur des Moleküls angenommen. Hingegen spielen Mutationen in den 'FPLD-Resten' durch die Veränderung einer möglichen Interaktionsstelle für bisher nicht identifizierte oder zugeordnete Bindungspartner eine vornehmlich funktionelle Rolle.

#### **4.8 Gründe für die fehlgeschlagene Rekrutierung der globulären Lamin A-Schwanzdomäne ins Kerninnere**

Die globuläre Schwanzdomäne des Lamin A-Proteins wurde in HeLa-Zellen exprimiert. Der ausgewählte Sequenzbereich reichte von Aminosäure 411 bis 551 und beinhaltete somit das Kernlokalisierungssignal. Die Konstrukte konnten in HeLa-Zellen exprimiert werden, die gewünschte Kernlokalisierung blieb trotz Vorhandenseins des Kernlokalisierungssignals, jedoch aus. Die Lamin A-Domäne reicherte sich zwar in einem Großteil der transfizierten Zellen in der Nähe des Kerns an, konnte aber vermutlich die Kernmembran nicht passieren. Neben dem Kernlokalisierungssignal ist das Vorhandensein der CaaX-Box von Bedeutung, welche das Konstrukt nicht enthielt. Die CaaX-Box wird im

Zytoplasma modifiziert und das dabei entstehende hydrophobe Ende scheint für die Direktion und Verankerung der Lamine in der Kernmembran wichtig zu sein (HOFE-MEISTER et al. 2000, KITTEN und NIGG 1991, KROHNE et al. 1989, VORBURGER et al. 1989). Das Fehlen der CaaX-Box könnte ein Grund für das Verbleiben des Proteins im Zytoplasma sein. Andererseits zeigt das Fehlen der CaaX-Box bei Lamin C, dass sie für die Kernlokalisation nicht essentiell ist. Es scheinen weitere Sequenzbereiche für die Kernlokalisation eine Rolle zu spielen, die dem erstellten Konstrukt fehlen.

#### **4.9 Die Progeria-Mutation**

Das verkürzte Lamin A-Protein, welches in Progeria-Patienten mit der Mutation G608G in LMNA vorkommt, wurde in HeLa-Zellen exprimiert. Die Zellkerne zeigten einen eindeutigen Phänotyp mit einer anormalen Lamin A-Verteilung in Form von großen Aggregaten, Strängen und distinkten Punkten. Die Transfektionseffizienz lag jedoch weit unter dem für eine aussagekräftige Auswertung benötigten Wert. Die Verwendung verschiedener Transfektionsagenzien und DNA-Konzentrationen brachte keine deutliche Verbesserung. Da die Versuche analog zu denen der anderen Lamin-Mutanten durchgeführt wurden, liegt die Problematik vermutlich in dem Konstrukt selbst. Es könnte in der Zukunft probiert werden, ob die Verwendung eines anderen Expressionsvektors bessere Ergebnisse liefert. Eventuell könnte das Konstrukt auch in einer anderen Zelllinie wie MCF7- oder HEK293-Zellen getestet werden.

#### **4.10 Funktionelle Analyse der Lamine durch RNA-Interferenz**

Die Expression von Lamin A/C, einem nicht essentiellen Protein, wurde in HeLa-Zellen mit Hilfe von siRNAs erfolgreich reduziert. In Zellen, die mit Lamin A/C-siRNAs transfiziert worden waren, lag Emerin im Zytoplasma vor beziehungsweise in ER-Strängen des Zytoplasmas (siehe 3.3 Abbildung 19b). Diese Beobachtung wurde ebenfalls in Zellen von LMNA-Null-Mäusen gemacht, deren postnatales Wachstum von Muskeldystrophie gekennzeichnet war (SULLIVAN et al. 1999), und ist somit mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im Einklang.

In Emerin reduzierten HeLa-Zellen (RNAi) wurde in Bezug auf das Lamin A/C-Expressionsmuster keine Veränderung im Vergleich zu Kontroll-Zellen beobachtet. Dies

bestätigt die Aussage von VAUGHAN et al. und korreliert mit den oben beschriebenen Ergebnissen, dass die Lokalisation von Emerin in der Kernhülle von Lamin A (VAUGHAN et al. 2001) beziehungsweise Lamin A/C abhängt und nicht umgekehrt.

Diese Resultate zeigen, dass die Reduktion der Genexpression durch siRNAs in Kulturzellen als eine Methode für die funktionelle Genanalyse eingesetzt werden kann.

#### 4.11 Ausblick

Die Fülle von verschiedensten Krankheiten, die mit LMNA in Verbindung stehen, macht die Komplexität und Vielfalt der Mechanismen klar, in die das Lamin A/C-Protein involviert ist. Die zunehmende Identifikation von Lamin A-Bindungspartnern liefert ein weites Feld für Untersuchungen, die bei der Aufklärung dieser Mechanismen helfen können.

Die vorliegende Arbeit könnte zu diesen Untersuchungen beitragen, indem man die vorhandenen Konstrukte dafür verwendet, die Auswirkungen der Mutationen auf andere Lamin A-Interaktionspartner wie beispielsweise den Transkriptionsfaktor SREBP1 (*sterol response element binding protein 1*), welcher unter anderem in die Adipogenese involviert ist oder Zymste24, eine Metalloprotease, die für die Prelamin A-Prozessierung von Bedeutung ist, zu untersuchen (LLOYD et al. 2002, PENDÁS et al. 2002). Dazu wäre es jedoch hilfreich, den vermeintlichen Einfluss der Überexpression durch den Vektor zu eliminieren. Dies wäre mittels der Verwendung eines regulierbaren Expressionsvektors möglich. Ein weiterer Vorteil wäre es, Zellen zu verwenden, die kein endogenes Lamin A oder C besitzen, um die Auswirkungen der Mutation ohne den Einfluss der endogenen Proteine zu untersuchen. Die Methode der siRNA-Interferenz hat sich für die spezifische Eliminierung von Transkripten und die Untersuchung betroffener Proteine in menschlichen Zellkultur-Zellen als geeignet herausgestellt. So würde eventuell neben der Verwendung von LMNA-Null-Zellen eine Möglichkeit darin bestehen, shRNAs (*small hairpin* RNAs, BRUMMELKAMP et al. 2002), die gegen das endogene Protein Lamin A gerichtet sind, mit den erstellten Lamin A-Mutanten-Konstrukten zu kotransfizieren. Es ist allerdings anzumerken, dass Patienten, die eine Lamin A-Mutation in ihrer DNA haben, in den meisten Fällen ein equimolares Verhältnis von mutierten und normalen LMNA-Genprodukten haben, da nur ein Allel betroffen ist.

Die Aufklärung der Ursachen für die Laminopathien ist eine interessante Aufgabe, bei der die Zusammenfügung von molekularbiologischem und medizinischem Wissen notwendig ist.

## 5 Zusammenfassung

Die Lamina liegt im Zellkern der inneren Kernmembran an und ist für die Funktion und die Struktur des Zellkerns wichtig. Den Hauptbestandteil der Lamina bilden die Lamine, die mit den Intermediärfilament-Proteinen des Zytoplasmas verwandt sind. Es gibt A- und B-Typ-Lamine. Die B-Typ-Lamine werden von zwei Genen, LMNB1 und LMNB2, kodiert. Die A-Typ-Lamine, Lamin A und Lamin C, entstehen durch alternatives Spleißen des kodierenden Gens, LMNA. Lamin A und Lamin C sind bis auf eine 90 Aminosäuren lange Region am C-terminus von Lamin A identisch.

Molekular-genetische Untersuchungen bei Patienten mit sehr verschiedenen Erkrankungen wie Muskeldystrophie, Lipodystrophie, Neuropathie oder der Krankheit des "frühen Alterns", Progerie, ergaben, dass diese Erkrankungen auf Mutationen im LMNA-Gen zurückzuführen sind. Es sind insgesamt neun LMNA assoziierte Krankheiten bekannt, die unter dem Begriff Laminopathien zusammengefasst werden. Der molekulare Mechanismus der Laminopathien ist bisher nicht bekannt, und es stellt sich die Frage, wie unterschiedliche Mutationen in einem einzigen Gen zu neun derart verschiedenen Krankheiten führen können. Zumal einige der Krankheiten durch unterschiedliche Mutationen an derselben Aminosäureposition ausgelöst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Mutationen ausgewählt, um auf molekularer Ebene die Auswirkungen der Mutationen auf das Lamin A-Protein und seine Interaktions- und Assoziationspartner in humanen Zelllinien zu untersuchen. Zwei der Mutationen (G465D und R482L) stehen im Zusammenhang mit der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) und die dritte (R527P) mit der partiellen familiären Lipodystrophie, Typ Dunnigan (FPLD). Die Mutationen wurden durch Mutagenese PCR in die C-terminale Domäne von Flag markierten Lamin A-Konstrukten eingeführt. HeLa-Zellen wurden anschließend mit den Mutanten- und Wildtyp-Konstrukten transfiziert. Lamin A akkumulierte im Zellkern zu Aggregaten, wobei die Anzahl der Aggregat tragenden Zellen mit zunehmender Zeit nach der Transfektion anstieg. 72 Stunden nach der Transfektion hatten 60-80% der Zellen, die mit Lamin A-Mutanten-Konstrukten transfiziert worden waren, Aggregate, während nur 35% der Wildtyp-Zellen Aggregate ausbildeten. Die mit Mutanten-Konstrukten transfizierten Zellen exprimierten 10-24 mal mehr Lamin A als nicht transfizierte Zellen. In Wildtyp-Zellen

wurde Lamin A 20fach überexprimiert. Lamin C, B1 und B2, Nup153, LAP2 und Emerin wurden in die Aggregate rekrutiert, was zu einer Abnahme dieser Proteine in der Kernperipherie führte. Die Aggregate der Mutanten-Zellen waren, sowohl in der Immunfluoreszenz- als auch in der Elektronenmikroskopie deutlich größer als die der Wildtyp-Zellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Mehrzahl der Aggregate im Kern mit der Kernmembran assoziiert sind und mit unterschiedlichem Ausmaß von ihr umschlossen werden. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Aggregat-Bildung teilweise auf die Überexpression zurückzuführen ist und dass es aber auch deutliche Mutanten spezifische Effekte gibt.

Eine LMNA-Mutation, die Patienten mit Progeria infantum aufwiesen, wurde zusätzlich untersucht. Hierbei ist das Gen-Produkt ein verkürztes Lamin A-Protein. Das entsprechende Konstrukt wurde erstellt und in HeLa-Zellen transfiziert. In den Kulturen wurden geringe Transfektionseffizienzen erzielt, die dennoch einen eindeutigen Phänotypen für die transfizierten Zellen lieferten. Lamin A war in den Immunfluoreszenzen nicht als Lamina typische ringförmige Anordnung unter der inneren Kernmembran zu sehen, sondern lag in Form von Aggregaten und Strängen im Kern vor.

Ein weiterer Teil der Arbeit widmete sich der Strukturaufklärung des Lamin A-Proteins. Im Focus stand die globuläre Domäne des Lamin A-Schwanzbereichs, die bei der Bindung von Interaktionspartnern eine wichtige Rolle spielt und darüber hinaus derjenige Bereich des Proteins ist, der von den oben beschriebenen Mutationen (G465D, R482L und R527P) betroffen ist. Für die geplante Röntgenkristallographie wurden große Mengen des Proteins in guter Qualität erstellt. Die Domäne ergab gute Kristalle. Die Arbeit mit den Kristallen wurde jedoch eingestellt, da die Struktur der Lamin A-Domäne in Kürze von einer anderen Arbeitsgruppe veröffentlicht werden sollte.

Die neue Methode der RNA-Interferenz vermittelt durch siRNAs wurde ebenfalls in die vorliegende Arbeit eingebunden. Durch den Einsatz dieser Methode kann die Expression eines spezifischen Proteins posttranskriptionell herunterreguliert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die RNA-Interferenz als Mittel zur funktionellen Analyse der Lamine in humanen Zelllinien getestet werden. Hierzu wurde die Expression von Lamin A/C und dem Kernmembranprotein Emerin in HeLa-Zellen durch siRNAs reduziert, die Auswirkungen auf die Zellen betrachtet und die Lokalisation beider Proteine bestimmt. Sowohl die Reduktion von Emerin, als auch die

Reduktion von Lamin A/C beeinflusste das Zellwachstum nicht, was bedeutet, dass diese Proteine für das Zellwachstum von HeLa-Zellen nicht essentiell sind. In Lamin A/C reduzierten Zellen war Emerin nicht mehr auf die Kernmembran limitiert, sondern trat zu einem Großteil im endoplasmatischen Retikulum auf. Die Reduktion von Emerin hatte andererseits keinen Einfluss auf das Lamin A/C-Expressionsmuster, das heisst, Lamin A ist durch zusätzliche Proteine normal gebunden.

Die vorliegende Arbeit belegt zum einen, dass Mutationen im LMNA-Gen spezifische Effekte auf das Polymerisationsverhalten und die Lokalisation von Lamin A und seine Interaktions- und Assoziationspartner in humanen Kulturzellen haben und zeigt zum anderen, dass die Reduktion der Genexpression durch siRNAs als Mittel für die funktionelle Genanalyse in kultivierten Zelllinien erfolgreich eingesetzt werden kann.

## 6 Literaturverzeichnis

**Aebi, U., J. Cohn, B. Buhle, L. Gerace (1986):** The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323:560-4.

**Belmont, S., Y. Zhai, A. Thilenius (1993):** Lamin B Distribution and Association with Peripheral Chromatin Revealed by Optical Sectioning and Electron Microscopy Tomography. *J. Cell Biol.* 123:1671-85.

**Bione, S., E. Maestrini, S. Rivella, M. Mancini, S. Regis, G. Romeo, D. Toniolo (1994):** Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet.* 8:323-7.

**Bonne, G., M.R. Di Barletta, S. Varnous, H.M. Becane, E.H. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, C.R. Greenberg, F. Gary, J.A. Urtizberea, D. Duboc, M. Fardeau, D. Toniolo, K. Schwartz (1999):** Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet.* 21:285-8.

**Bossie, C.A., M.M. Sanders (1993):** A cDNA from *Drosophila melanogaster* encodes a lamin C-like intermediate filament protein. *J Cell Sci.* 104:1263-72.

**Boyle, A.S., S. Gilchrist, J.M. Bridger, N.L. Mahy, J.A. Ellis, W.A. Bickmore (2001):** The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* 10:211-219.

**Broers, J.L.V., B. M. Machiels, H.J.H. Kuipers, F. Smedts, R. van den Kieboom, Y. Raymond, F.C.S. Ramaekers (1997):** A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem. Cell Biol.* 107:505-17.

**Brummelkamp, T.R., R. Bernards, R. Agami (2002):** A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 296:550-3.

**Cao, H., R.A. Hegele (2000):** Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 9:109-12.

**Chen, L., L. Lee, B.A. Kudlow, H.G. Dos Santos, O. Sletvold, Y. Shafeghati (2003):** LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 362:440-5.

**Clements, L., S. Manilal, D.R. Love, G.E. Morris (2000):** Direct Interaction between Emerin and Lamin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:709-14.

**Cohen, M., K.K. Lee, K.L. Wilson, Y. Gruenbaum (2001):** Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem. Sci.* 26:41-7.



**DeBusk, F.L. (1972):** The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Report of 4 cases and review of the literature. *J. Pediatr.* 80:697-724.

**Dechat, T., B. Korbei, O.A. Vaughan, S. Vlcek, C.J. Hutchison, R. Foisner (2000):** Lamina-associated polypeptide 2 $\alpha$  binds intranuclear A-type lamins. *J. Cell Sci.* 113:3473-84.

**De Sandre-Giovannoli, A., M. Chaouch, S. Kozlov, J.-M. Vallat, M. Tazir, N. Kassouri, P. Szepetowski, T. Hammadouche, A. Vandenberghe, C.L. Stewart, D. Grid, N. Lévy (2002):** Homozygous Defects in LMNA, Encoding Lamin A/C Nuclear-Envelope Proteins, Cause Autosomal Recessive Axonal Neuropathy in Human (Charcot-Marie-Tooth Disorder Type 2) and Mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 70:726-36.

**Dessev, G., C. Iovcheva-Dessev, J.R. Bischoff, D. Beach, R. Goldman (1991):** A complex containing p34<sup>cdc2</sup> and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J. Cell Biol.* 112:523-33.

**Dhe-Paganon, S., E.D. Werner, Y.I. Chi, S.E. Shoelson (2002):** Structure of the Globular Tail of Nuclear Lamin. *J. Biol. Chem.* 144:225-40.

**Di Barletta, M.R., E. Ricci, G. Galluzzi, P. Tonali, M. Mora, L. Morandi, A. Romorini, T. Voit, K.H. Orstavik, L. Merlini, C. Trevisan, V. Biancalana, I. Housmanowa-Petrusewicz, S. Bione, R. Ricotti, K. Schwartz, G. Bonne, D. Toniolo (2000):** Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1407-12.

**Dyer, J.A., E.B. Lane, C.J. Hutchison (1999):** Investigations of the pathway of incorporation and function of lamin A in the nuclear lamina. *Micrsc. Res. Technique* 45:1-12

**Elbashir, S. M, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl (2001):** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature* 411:494-8.

**Elbashir, S.M., J. Harborth, K. Weber, T. Tuschl (2002):** Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199-213.

**Emery, A.E.H., F.E. Dreifuss (1966):** Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 29:338-42.

**Emery, A.E.H. (1989):** The Emery-Dreifuss-Syndrom. *J. Med. Genet.* 26:637-41.

**Eriksson, M., W.T. Brown, L.B. Gordon, M.W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M.R. Erdos, C.M. Robbins, T.Y. Moses, P. Berglund, M. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A.B.**

**Csoka, M. Boehnke, T.W. Glover, F.S. Collins (2003):** Recurrent *de novo* point mutation in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrom. *Nature* 423:293-8.

**Fairley, E.A.L., J. Kendrick-Jones, J.A. Ellis (1999):** The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *J. Cell Sci.* 112:2571-82.

**Fatkin, D., C. MacRae, T. Sasaki, M.R. Wolff, M. Porcu, M. Frenneaux, J. Atherton, H.J. Jr. Vidaillet, S. Spudich, U. De Girolami, J.G. Seidman, C.E. Seidman, F. Muntoni, G. Muehle, W. Johnson, B. McDonough (1999):** Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of cardiomyopathy and conduction-system disease. *N. Engl. J. Med.* 341:1715-24.

**Fidzianska, A., D. Toniolo, I. Hausmanowa-Petrusewicz (1998):** Ultrastructural abnormality of sarcolemmal nuclei in Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). *J. Neurol. Sci.* 159:88-93.

**Fidzianska, A., , I. Hausmanowa-Petrusewicz (2003):** Architectural abnormalities in muscular nuclei. Ultrastructural differences between X-linked and autosomal dominant forms of EDMD. *J. Neurolog. Sci.* 210:47-51.

**Fisher, D.Z., N. Chaudhary, G. Blobel (1986):** cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83:6450-4.

**Foisner, R., L. Gerace (1993):** Integral Membrane Proteins of the Nuclear Envelope Interact with Lamins and Chromosomes, and Binding Is Modulated by Mitotic Phosphorylation. *Cell* 73:1267-79.

**Furukawa, K., Y. Hotta (1993):** cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.* 12:97-106

**Furukawa, K., H. Inagaki, Y. Hotta (1994):** Identification and Cloning of an mRNA Coding for a Germ Cell-Specific A-Type Lamin in Mice. *Exp. Cell Res.* 212:426-30.

**Gant, T.M., C.A. Harris, K.L. Wilson (1999):** Roles of LAP2 Proteins in Nuclear Assembly and DNA Replication: Truncated LAP2 $\beta$  Proteins Alter Lamina Assembly, Envelope Formation, Nuclear Size, and DNA Replication Efficiency in *Xenopus laevis* Extracts. *J. Cell Biol.* 144:1083-96.

**Garg, A., R.A. Speckman, A.M. Bowcock (2002):** Multisystem Dystrophy Syndrome Due to Novel Missense Mutations in the Amino-Terminal Head and Alpha-Helical Rod Domains of the Lamin A/C Gene. *Am. J. Med.* 112:549-55.

**Geisler, N., K. Weber (1982):** The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. *EMBO J.* 1:1649-56.

**Gerace, L., G. Blobel (1980):** The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19:277-87.

**Glass, C.A., J.R. Glass, H. Taniura, K.W. Hasel, J.M. Blevitt, L. Gerace (1993):** The alpha-helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *EMBO J.* 12:4413-24.

**Goldberg, M., H. Jenkins, T. Allen, W.G. Whitfield, C.J. Hutchison (1995):** *Xenopus* lamin B3 has a direct role in the assembly of a replication competent nucleus: evidence from cell-free egg extracts. *J. Cell Sci.* 108:3451-61.

**Goldman, R.D., Y. Gruenbaum, R.D. Moir, D.K. Shumaker, T.P. Spann (2002):** Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16:533-47.

**Gruenbaum, Y., Y. Landesman, B. Drees, J.W. Bare, H. Saumweber, M.R. Paddy, J.W. Sedat, D. E. Smith, B.M. Benton, P.A. Fisher (1988):** *Drosophila* Nuclear Lamin Precursor Dm0 Is Translated from Either of Two Developmentally Regulated mRNA Species Apparently Encoded by a Singel Gene. *J. Cell Biol.* 106:585-96.

**Gruenbaum, Y., K.L. Wilson, A. Harel, M. Goldberg, M. Cohen (2000):** Review: Nuclear Lamins-Structural Proteins with Fundamental Functions. *J. Struct. Biol.* 129:313-23.

**Harborth, J., S.M. Elbashir, K. Bechert, T. Tuschl, K. Weber (2002):** Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114:4557-65.

**Heald, R., F. McKeon (1990):** Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61:579-89.

**Hofemeister, H., K. Weber, R. Stick (2000):** Association of Prenylated Proteins with the Plasma Membrane and the Inner Nuclear Membrane Is Mediated by the Same Membrane-targeting Motifs. *Mol. Biol. Cell* 11:3233-46.

**Hofemeister, H., C. Kuhn, W. W. Franke, K. Weber, R. Stick (2002):** Conservation of the gene-structure and membrane-targeting signals of germ cell-specific lamin LIII in amphibians and fish. *Eur. J. Cell. Biol.* 81:51-60.

**Hutchison, C.J., M. Alvarez-Reyes, O.A. Vaughan (2000):** Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J. Cell Sci.* 144:9-19.

**Imai, S.I., S. Nishibayashi, K. Takao, M. Tomifuji, T. Fujino, M. Hasegawa, T. Takano (1997):** Dissociation of Oct-1 from the Nuclear Peripheral Structure Induces the Cellular Aging-associated Collagenase Gene Expression. *Mol. Biol. Cell* 8:2407-19.

**Izumi, M., O.A. Vaughan, C.J. Huchison, D.M. Gilbert (2000):** Head and/or CaaX Domain Deletions of Lamin Proteins Disrupt Preformed Lamin A and C But Not Lamin B Structure in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* 11:4323-37.

**Kitten, G.T., E.A. Nigg (1991):** The CaaX Motif Is Required for Isoprenylation, Carboxyl Methylation, and Nuclear Membrane Association of Lamin B2. *J. Cell Biol.* 113:13-23.

**Köbberling, J., M.G. Dunnigan (1986):** Familial partial lipodystrophy: two types of an X linked dominant syndrome, lethal in the hemizygous state. *J. Med. Genet.* 23:120-7.

**Köbbernick, K., (2000):** Dissertation, Abteilung Entwicklungsbiochemie, Universität Göttingen.

**Krimm, I., C. Östlund, B. Gilquin, J. Couprie, P. Hossenlopp, J.-P. Mornon, G. Bonne, J.-C. Courvalin, H.J. Worman, S. Zinn-Justin (2002):** The Ig-like Structure of the C-Terminal Domain of Lamin A/C, Mutated in Muscular Dystrophies, Cardiomyopathy, and Partial Lipodystrophy. *Structure* 10:811-23.

**Krohne, G., I. Waizenegger, T.H. Höger (1989):** The Conserved Carboxy-Terminal Cysteine of Nuclear Lamins Is Essential Association with the Nuclear Envelope. *J. Cell Biol.* 109:2003-11.

**Laemmli, U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the haed of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

**Lenz-Böhm, B., J. Wismar, S. Fuchs, R. Reifegerste, E. Buchner, H. Betz, B. Schmitt (1997):** Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelope, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J. Cell Biol.* 137:1001-16.

**Liu, J., T. R. Ben-Shahar, D. Riemer, M. Treinin, P. Spann, K. Weber, A. Fire, Y. Gruenbaum (2000):** Essential Roles for *Caenorhabditis elegans* Lamin Gene in Nuclear Organization, Cell Cycle Progression, and Spatial Organization of Nuclear Pore Complexes. *Mol.Biol. Cell* 11:3937-47.

**Lloyd, D.J., R.C. Trembath, S. Shackleton (2002):** A novel interaction between lamin A and SREBP1: implication for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* 11:769-77.

**Machiels, B.M., A.H.G. Zorenc, J.M. Endert, H.J.H. Kuijpers, G.J.J.M. van Eys, F. C. Ramaekers, J.L.V. Broers (1996):** An Alternative Splicing Product of the Lamin A/C Gene Lacks Exon 10. *J. Biol. Chem.* 271:9249-53.

**Mancini, M.A., B. Shan, J.A. Nickerson, S. Penman, W.H. Lee (1994):** The retinoblastoma gene product is a cell-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:418-22.

**McKeon, F.D., M.W. Kirschner, D. Caput (1986):** Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319:463-8.

**Meier, J., H.Campbell, C.C. Ford, R. Stick, C.J. Hutchison (1991):** The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J. Cell Sci.* 98:271-9.

**Moir, R.D., M. Montag-Lowy, R.D. Goldman (1994):** Dynamic Properties of Nuclear Lamins: Lamin B Is Associated with Sites of DNA Replication. *J. Cell Biol.* 125:1201-12.

**Moir, R.D., M.Yoon, S. Khuon, R.D. Goldman (2000):** Nuclear Lamins A and B1: Different Pathways of Assembly during Nuclear Envelope Formation in Living Cells. *J. Cell Biol.* 151:1155-68.

**Morris, G.E., S. Manilal (1999):** Heart to heart: from nuclear proteins to Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 8:1847-51.

**Muchir, A., G. Bonne, A.J. van der Kooi, M. van Meegen, F. Baas, P.A. Bolhuis, M. de Visser, K. Schwartz (2000):** Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Mol. Genet.* 9:1453-9.

**Mullis, K.B., F.A. Faloona (1987):** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.

**Nigg, E.A., G.T. Kitten, K. Vorbürger (1992):** Targeting lamin protein to the nuclear envelope: the role of CaaX box modifications. *Biochem. Soc. Trans.* 20:500-4.

**Novelli, G., A. Muchir, F. Sangiulio, A. Helbing-Leclerc, M.R. D'Apice, C. Massart, F. Capon, P. Sbraccia, M. Federici, R. Lauro, C. Tudisco, R. Pallotta, G. Scarano, B. Dallapiccola, L. Merlini, G. Bonne (2002):** Mandibuloacral Dysplasia Is Caused by a Mutation in LMNA-Encoding Lamin A/C. *Am. J. Hum. Genet.* 71:426-31.

**Östlund, C., J. Ellenberg, E. Hallberg, J. Lippincott-Schultz, H.J. Worman (1999):** Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *J. Cell Sci.* 112:1709-19.

**Östlund, C., G. Bonne, K. Schwartz, H.J. Worman (2001):** Properties of lamin A mutant found in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, cardiomyopathy and Dunnigan-type partial lipodystrophy. *J. Cell. Sci.* 114:4435-45.

**Paddy, M.R., A.S. Belmont, H. Saumweber, D.A. Agard, J.W. Sedat (1990):** Interphase Nuclear Envelope Lamins Form a Discontinuous Network That Interacts with Only a Fraction of the Chromatin in the Nuclear Periphery. *Cell* 62:89-106.

**Panté, N., U. Aebi (1994):** Towards the Molecular Details of the Nuclear Pore Complex. *J. Struct. Biol.* 113:179-89.

**Pendás, A.M., Z. Zhou, J. Cadinanos, J.M.P. Freije, J. Wang, K. Hultenby, A. Astudillo, A. Wernerson, F. Rodríguez, K. Tryggvason, C. López-Otín (2002):** Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat. Genet.* 31:94-9.

**Peter, M., J. Nakagawa, M. Dorree, J.C. Labbe, E.A. Nigg (1990):** In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61(4):591-602.

**Raharjo, W.H., P. Enarson, T. Sullivan, C.L. Stewart, B. Burke (2001):** Nuclear envelope defects associated with LMNA mutations cause dilated cardiomyopathy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J. Cell Sci.* 114:4447-57.

**Riemer, D., J. Wang, A. Zimek, B.J. Swalla, K. Weber (2000):** Tunicate have unusual nuclear lamins with a large deletion in the carboxyterminal tail domain. *Gene* 225:317-25.

**Röber, R.-A., K. Weber, M. Osborn (1989):** Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 105:365-78.

**Rupp, R.A., L. Snider, H. Weintraub (1994):** Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev.* 8(11):1311-23.

**Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989):** Molecular cloning. A laboratory manual. 2. Edition. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

**Shackelton, S., D.J. Lloyd, S.N.J. Jackson, R. Evans, M.F. Niermeijer, B.M. Singh, H. Schmidt, G. Brabant, S. Kumar, P.N. Durrington, S. Gregory, S. O'Rahilly, R.C. Trembath (2000):** LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nature Genet.* 24:153-6.

- Smythe, C., H.E. Jenkins, C.J. Hutchison (2000):** Incorporation of the nuclear pore basket protein Nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *EMBO J.* 19:3918-31.
- Spann, T.P., A.E. Goldman, C. Wang, S. Huang, R.D. Goldman (2002):** Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J. Cell Biol.* 156:603-8.
- Stierlé, V., J. Couprie, C. Östlund, I. Krimm, S. Zinn-Justin, P. Hossenlopp, H.J. Worman, J.-C. Courvalin, I. Duband-Goulet (2003):** The Carboxyl-Terminal Region Common to Lamins A and C Contains a DNA Binding Domain. *Biochem.* 42:4819-28.
- Stuurman, N., S. Heins, U. Aebi (1998):** Nuclear Lamins: Their Structure, Assembly, and Interactions. *J. Struct. Biol.* 122:42-66.
- Sullivan, T., D. Escalante-Alcalde, J. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C.L. Stewart, B. Burke (1999):** Loss of A-type Lamin Expression Compromises Nuclear Envelope Integrity Leading to Muscular Dystrophy. *J. Cell Biol.* 147:913-9.
- Vaughan, O.A., M. Alvarez-Reyes, J.M. Bridger, J.L.V. Broers, F.C.S. Ramaekers, M. Wehnert, G.E. Morris, W.G.F. Whithfield, C.J. Hutchison (2001):** Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* 114:2577-90.
- Vigouroux, C., M. Auclair, E. Dubosclard, M. Pouchelet, J. Capeau, J.-C. Courvalin, B. Buendia (2001):** Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J. Cell Sci.* 114:4459-68.
- Vorburger, K., G.T. Kitten, E.A. Nigg (1989):** Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif. *EMBO J.* 8:4007-13.
- Walther, T.C., M. Fornerod, H. Pickersgill, M. Goldberg, T.D. Allen, I.W. Mattaj (2001):** The nucleoporin Nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins. *EMBO J.* 20:5703-14.
- Weber, K., U. Plessmann, P. Traub (1989):** Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS lett.* 257:411-4.
- Wilson, K.L. (2000):** The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression. *Trends Cell Biol.* 10:125-8.
- Wilson, K.L., M.S. Zastrow, K.K. Lee (2001):** Lamins and Disease: Insights into Nuclear Infrastructure. *Cell* 104:647-50.

**Worman, H.J., J. Yuan, G. Blobel, S.D. Georgatos (1988):** A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8531-4.

**Yang, L.,T., Guan, L. Gerace (1997):** Lamin-binding Fragment of LAP2 Inhibits Increase in Nuclear Volume during the Cell Cycle and Progression into S Phase. *J. Cell Biol.* 139:1077-87.



## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Weber für die Aufnahme in seine Abteilung, die stetige Förderung und die Möglichkeit zur Entfaltung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Frau Prof. Dr. Mary Osborn möchte ich für ihr Engagement und die Ideen danken, die diese Arbeit ganz wesentlich vorangetrieben haben.

Meinem Mentor Prof. Dr. Jürgen Wehland danke ich für die freundliche Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Ich danke Frau Prof. Dr. Brigitte Jockusch für die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte allen Mitarbeitern der Abteilung danken insbesondere: Stefan Westermann und Franziska Gerlach.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt und ermutigt haben und ohne die diese Arbeit und die Betreuung und Unterhaltung meiner Pferde nicht möglich gewesen wäre.